



Noelia Giselle Romero

Licenciada em Ciência e Tecnologia da Produção Aplicada aos Alimentos
(Universidad Nacional de Itapua)

Extração de compostos fenólicos a partir de café e sua caracterização química e funcional

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves,
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Catarina Pereira Nobre, Mestre em Bioenergia da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof. Doutora Elisabete Muchagato Maurício
Vogal: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho 2017

Noelia Giselle Romero

Licenciada em Ciência e Tecnologia da Produção Aplicada aos
Alimentos
(Universidad Nacional de Itapua)

**Extração de compostos fenólicos a partir
de café e sua caracterização química e
funcional**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciência e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Catarina Pereira Nobre, Mestre em Bioenergia da
Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa

Julho 2017

Copyright

“Extração de compostos fenólicos a partir de café e sua caracterização química e funcional”

Copyright © Noelia Giselle Romero, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À professora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, pela boa disposição e carinho com que me brindou no percurso do mestrado.

À Professora Margarida Gonçalves, a quem agradeço a confiança, transmissão de conhecimentos, suporte científico e geral na minha realização profissional. Foi um privilégio tê-la como orientadora, tenho a certeza que aprendi com uma das mentes mais brilhantes.

À minha co-orientadora Catarina Nobre, guia dia a dia, ela é a pessoa que mais se esforçou em esclarecer as minhas dúvidas, a amiga que ofereceu o seu tempo, as suas forças, que acompanhou a realização deste trabalho desde o momento inicial até o fim. Ela tem a minha admiração e faz-me querer ser melhor no que faço. Um muito obrigada não é suficiente para agradecer a disponibilidade e simpatia demonstradas. Uma profissional que ganha o respeito de todos, obrigada por seres a luz que me encaminhou neste trabalho de tese.

À professora Maria Paula Duarte, pelo apoio numa das fases deste trabalho de dissertação, obrigada pela disponibilidade e contribuição científica.

Aos meus colegas de laboratório, Ricardo, Inês, Marcelo, Mariana, Vasco, Liliana e Ezequiel. O seu apoio fez-me valorizar o trabalho em equipa, obrigada pelas risadas, carinho e ajuda incondicional. O laboratório não foi simplesmente um espaço de trabalho, também representou a formação de uma grande família.

Aos meus queridos amigos, Elba e Marcelo, quero agradecer pelo imenso apoio e ajuda. Obrigada pela paciência e conselhos, estimo-vos e agradeço por serem os meus pilares neste trajeto. Uma vida sem amigos não é vivida da mesma forma.

Às minhas caras colegas de casa, Carolina e Catarina, elas testemunharam muitas noites sem dormir, muitos fins de dia cansativos depois do laboratório. Muito obrigada pelo carinho e amizade formada.

Ao Programa Fellow Mundus pela oportunidade de fazer uma fase da minha formação neste país e nesta instituição, representando mudanças positivas no sentido profissional e pessoal.

À minha família: meus avós, minha mãe e irmãos, agradeço pela ajuda apesar da distância, pelo amor incondicional, isto tornar-se-ia impossível sem o apoio e confiança depositados em mim.

Ao Vasco, obrigada pela constante ajuda, conselhos e apoio incondicional. Os momentos de estudo e trabalho foram melhores na tua companhia.

Aos meus avós, Eulógio e Silvia.

Resumo

No processo produtivo de café, alguns lotes com menor qualidade do ponto de vista de aroma e sabor são descartados para não prejudicarem negativamente a qualidade da bebida, e são utilizados na produção de biocombustíveis sólidos. No entanto estes lotes de café contêm compostos fenólicos de grande valor nutracêuticos que podem ser extraídos e valorizados antes de se utilizar o grão rejeitado em aplicações energéticas.

Neste trabalho testou-se a extração de compostos fenólicos a partir de um lote de café em pó rejeitado, por maceração e por extração a refluxo, utilizando acetona, água, misturas destes solventes (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) e uma solução aquosa de hidróxido de cálcio 0,01%. O rendimento de extração bem como as concentrações de compostos fenólicos (reação de Folin-Ciocalteu), e a atividade antiradicalar (DPPH), dos extratos mostraram uma forte dependência da quantidade de água nos extratos e foram superiores nos ensaios de extração a refluxo do que nos ensaios de maceração, atingindo rendimentos de extração superiores a 30% nos extratos com mais de 50% de água. Nos ensaios de maceração a presença de concentrações superiores de acetona permitiu ultrapassar limitações de transferência de massa da matriz, nomeadamente a presença de óleo de café. Este óleo foi extraído com hexano e caracterizado por GC-MS tendo revelado quantidades elevadas de ácido linoleico. A extração por refluxo com misturas de acetona e água produziu extratos ricos em compostos fenólicos, atingindo 600 mg EAG/g de extrato, na fração 1 do extrato produzido com 60% acetona, e 594,2 mg EAG/g de extrato na mesma fração produzida com acetona a 50%. Estes dois extratos apresentaram também percentagens de inibição do radical DPPH acima de 50%, para uma concentração de 0,1 mg/mL. A atividade anti-radicalar e o teor de fenólicos dos extratos apresentaram uma correlação positiva forte ($r=0,8$). Os extratos de café e diversos compostos fenólicos individuais não apresentaram atividade antimicrobiana relativamente às bactérias *S. Aureus* e *E. Coli*), quando estudada em níveis de concentração de 50 mg/mL e 100 mg/mL, pelo método de difusão em agár. O perfil de compostos fenólicos dos extratos avaliado por HPLC- DAD revelou a presença de diversos ácidos hidroxicinâmicos e os compostos maioritários identificados e quantificados foram, por ordem de decrescente de concentração: cafeína, 5-ACG, 3-ACG e 4-ACG. Os extratos foram também submetidos a digestão gastrointestinal *in vitro*, e a caracterização dos extratos brutos e dos digeridos evidenciou uma redução superior a 70% da bioacessibilidade e biodisponibilidade dos ácidos clorogénicos e da cafeína.

A utilização de acetona aquosa em diferentes proporções exibiu um potencial significativo na extração de compostos bioativos de café rejeitado através da extração por refluxo, em proporções equivalentes ou até superiores às soluções aquosas e permitindo um menor gasto energético na recuperação de solvente, aspeto relevante ao nível industrial. Em conclusão, a valorização de grãos rejeitados poderá permitir um acréscimo na cadeia de valor da indústria de café, e o resíduo remanescente após a extração poderá ainda ser encaminhado para valorização energética.

Palavras-chave: Café rejeitado, acetona, refluxo, compostos fenólicos, antioxidantes, ácidos clorogénicos

Abstract

In the process of coffee production, some lots with lower quality from the point of view of aroma and flavor are discarded so as not to negatively affect the quality of the beverage, and are used in the production of solid biofuels. However, these coffee lots contain phenolic compounds of high nutraceutical value that can be extracted and valorized before using the rejected grains in energy applications.

In this work the extraction of phenolic compounds from a batch of discarded coffee powder was evaluated by maceration and by reflux extraction using acetone, water, mixtures of these solvents (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) and a 0.01% aqueous calcium hydroxide. The extraction yield as well as the concentrations of phenolic compounds (Folin-Ciocalteu reaction) and antiradicalar activity (DPPH) of the extracts showed a strong dependence on the amount of water in the extracts and were higher in the reflux extraction tests than in the maceration trials, reaching extraction yields of more than 30% for extracts with more than 50% water. In the maceration tests, the presence of higher concentrations of acetone allowed to overcome limitations of mass transfer of the matrix, namely the presence of coffee oil. This oil was extracted with hexane and characterized by GC-MS having revealed high amounts of linoleic acid. Refluxing with acetone and water mixtures yielded extracts rich in phenolic compounds, reaching 600 mg EAG / g extract, in fraction 1 of the extract produced with 60% acetone, and 594.2 mg EAG / g extract in the same fraction produced with 50% acetone. These two extracts also showed percentages of DPPH radical inhibition above 50%, at a concentration of 0.1 mg / mL. The anti-radical activity and the phenolic content of the extracts showed a strong positive correlation ($r = 0.8$). Coffee extracts and several individual phenolic compounds did not present antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* bacteria when studied at concentration levels of 50 mg / mL and 100 mg / mL, using the agar diffusion method. The phenolic profile of the extracts evaluated by HPLC-DAD revealed the presence of several hydroxycinnamic acids and the major compounds identified and quantified were, in order of decreasing concentration: caffeine, 5-ACG, 3-ACG and 4-ACG. The extracts were also submitted to gastrointestinal digestion in vitro, and the characterization of crude extracts and digests evidenced a reduction of more than 70% in bioaccessibility and bioavailability of chlorogenic acids and caffeine.

The use of acetone:water mixtures for the extraction of bioactive compounds from discarded coffee by refluxing, exhibited equivalent or even better yields than 100% water and allows a lower energetic cost in the solvent recovery step, a relevant aspect at the industrial level. In conclusion, the valorization of rejected grains may increase the value chain of the coffee industry and the remaining residue after extraction may still be sent for energy recovery.

Keywords: Coffee waste, acetone, reflux, phenolic compounds, antioxidants, chlorogenic acids.

Índice

Copyright	v
Agradecimentos	vii
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Índice de tabelas	xvii
Índice de figuras	xix
Lista de abreviaturas	xxiii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 História do Café	1
1.2 O cafeeiro	1
1.2.1 Cultivares de Coffea arabica	1
1.2.2 Cultivares de Coffea canephora	2
1.3 Composição química de grãos de café verde	6
1.4 Processamento do café	9
1.5 Subprodutos e resíduos da indústria do café	11
1.5.1 Polpa e casca de café	12
1.5.2 Película prateada (silverskin)	13
1.5.3 Borrás de café (spent coffee grounds)	13
1.5.4 Café “rejeitado” – Critérios de qualidade	14
1.6 Componentes funcionais do café	15
1.6.1 Antioxidantes	17
1.6.2 Perfil de componentes fenólicos	18
1.6.3 Cafeína	21
1.6.4 Trigonelina	22
1.6.4 Diterpenos	24
1.7 Extratos produzidos a partir de diferentes matrizes da indústria do café	24
1.7.1 Biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos fenólicos	28
1.7.2 Utilização comercial e aplicações potenciais de extratos de café	29
1.8 Motivação e objetivos do trabalho	31
Capítulo 2 - Metodologia	33
2.1 Matéria-prima	33
2.2 Caracterização da matéria-prima	33
2.2.1 Determinação do teor de humidade	33
2.2.2 Determinação do teor de cinzas	34
2.2.3 Determinação do teor de gordura	34
2.2.4 Identificação dos ácidos gordos presentes no óleo de café	34
2.2.5 Determinação de proteína total	35

2.2.6 Carboidratos totais	36
2.3 Produção de extratos a partir de café torrado e moído	36
2.3.1 Maceração	36
2.3.2 Extração a refluxo	36
2.4 Caracterização dos extratos de café produzidos	37
2.4.1 Determinação do rendimento de extração	37
2.4.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais – Método de Folin-Ciocalteu	37
2.4.3 Determinação da atividade antioxidante – DPPH.....	38
2.4.4 Determinação de açúcares redutores	39
2.4.5 Atividade antimicrobiana dos extratos de café	40
2.5 Avaliação da influência da acetona nos extratos produzidos	41
2.6 Análise dos compostos presentes nos extratos de café por HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de díodos)	41
2.7 Digestão gastrointestinal simulada de um extrato de café selecionado	43
2.7.1 Digestão gástrica simulada.....	43
2.7.2 Digestão gastrointestinal simulada	43
2.7.3 Análise dos digeridos	44
2.8 Tratamento estatístico dos resultados.....	44
Capítulo 3 - Apresentação e discussão de resultados	45
3.1 Caracterização da amostra de café.....	45
3.2 Produção e caracterização de extratos de café	48
3.2.1 Extração por maceração	49
3.2.2 Extração por refluxo	55
3.3 Efeito da evaporação da acetona no teor de fenólicos e atividade anti-radicalar.....	73
3.4 Análise dos compostos presentes em extratos de café selecionados, por HPLC-DAD	78
3.5 Avaliação da digestão gastrointestinal in vitro num extrato de café seleccionado	86
Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras	91
Referências bibliográficas	94

Índice de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Características e requerimentos para o cultivo de café	3
Tabela 1.2 - Os principais componentes dos grãos de café verde (% m/m em base seca).....	7
Tabela 1.3 - Composição química do café (% m/m, base seca)	8
Tabela 1.4 – Produção total de café por continente exportador, em milhares de sacos de 60 kg.	11
Tabela 1.5 - Aplicações dos principais subprodutos da indústria do café.	14
Tabela 1.6 – Designação e estruturas químicas dos principais compostos bioativos do café.	16
Tabela 1.7 - Classes de compostos fenólicos de ocorrência natural em plantas superiores	19
Tabela 1.8 - Trabalhos que utilizam diferentes sistemas de extração e o efeito na quantidade de compostos fenólicos obtidos a partir de cada técnica.	28

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Programa do gradiente utilizado para análise das amostras de extratos de café.	42
Tabela 2.2 - Padrões utilizados neste trabalho, comprimento de onda máximo (nm), concentrações utilizadas (mg/L), equação da reta de calibração e coeficiente de correlação correspondentes.....	43
Tabela 2.3 - Classificação das correlações de acordo com o valor obtido para o coeficiente de correlação de Pearson.	44

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Perfil nutricional da amostra de café utilizada neste trabalho.	45
Tabela 3.2 - Análise cromatográfica do óleo de café: Picos identificados, estrutura, nome e abundância relativa.....	48
Tabela 3.3 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por maceração, expressos em mg EAG/g extrato.....	51
Tabela 3.4 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg EAG/g de extrato.....	54
Tabela 3.5 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por refluxo, para as 5 frações recolhidas, expressos em mg EAG/g extrato.....	60
Tabela 3.6 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg ET/g de extrato.....	65
Tabela 3.7 – Valores médios e desvios-padrão para os valores da percentagem de inibição, obtida para uma concentração aproximada de extrato de 0,1 mg/mL, para as frações 1 e 2 da extração por refluxo, para os diferentes solventes em estudo.	67

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 - Obtenção de subprodutos de café	10
Figura 1.2 - Secção transversal da cereja de café	11
Figura 1.3 - Classificação dos antioxidantes.....	17
Figura 1.4 - Estruturas e nomenclatura dos ácidos clorogénicos comuns e dos seus blocos de construção, ácido quínico e ácido cafeico.	20
Figura 1.5 - Estrutura química da cafeína.....	21
Figura 1.6 - Estrutura química da trigonelina	23
Figura 1.7 - Conversão de ácido nicotínico em trigonelina.....	23
Figura 1.8 - Estrutura química dos diterpenos cafestol e kahweol.....	24
Figura 1.9- Extrato líquido de café comercial, extrato líquido de café verde e Garcinia Cambogia e extrato em cápsula de café verde.....	30

Capítulo 2

Figura 2.1– Amostra de café torrado e moído utilizado neste estudo.	33
Figura 2.3 - Exemplo de recta de calibração para a determinação de fenólicos totais, utilizada neste trabalho.	38
Figura 2.4 - Demonstração da estabilização do radical livre DPPH.....	38
Figura 2.5 - Exemplo de recta de calibração para a determinação de atividade anti-radicalar (DPPH), utilizada neste trabalho.	39
Figura 2.6 - Recta de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores pelo método DNS.....	40

Capítulo 3

Figura 3.1 - Cromatograma do perfil de ácidos gordos do óleo de café produzido a partir da amostra de café em estudo, com tempos de retenção (min).	47
Figura 3.2 - Extratos obtidos por maceração 24 h (de acetona 100% até 60%).	49
Figura 3.3 - Rendimentos de extração (% m/m) obtidos para a maceração de 24 h, para os diferentes solventes utilizados.....	50
Figura 3.4 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por maceração, expresso em mg EAG/g café.	52
Figura 3.5 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg EAG/g de café.....	54
Figura 3.6 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/g de extrato) e a atividade anti-radicalar (mgET/g de extrato) para os extratos produzidos por maceração para os diferentes solventes.....	55

Figura 3.7 - Extratos obtido por refluxo: A – Extração com 100% acetona (5 frações). B - Extração com 60% acetona (5 frações).	56
Figura 3.8 - Rendimentos de extração (% m/m) obtidos para cada uma das 5 frações recolhidas de cada solvente utilizado, na extração por refluxo.	57
Figura 3.9 - Média dos rendimentos obtidos em cada fração (todos os solventes).	57
Figura 3.10 – Somatório dos rendimentos das frações recolhidas, correspondendo ao rendimento total (% m/m) para cada solvente analisado.....	58
Figura 3.11 - Comparação de rendimentos (% m/m) de maceração, fração 1 de refluxo e refluxo total (somatório das 5 frações).....	59
Figura 3.12 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por refluxo, para as 5 frações recolhidas, expresso em mg EAG/g café.....	61
Figura 3.13 - Valores médios para o teor de fenólicos totais (mg EAG/g extrato) obtidos na maceração 24 h e na fração 1 da extração por refluxo.	64
Figura 3.14 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por refluxo, para as 5 frações sucessivas, expressos em mg EAG/g de café.	66
Figura 3.15 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/g de extrato) e a atividade anti-radicalar (mgET/g de extrato) para os extratos da fração 1 produzidos por refluxo para os diferentes solventes.	68
Figura 3.16 - Comparação entre os somatórios médios das frações 1 e 2 dos extratos obtidos por refluxo, relativamente ao teor em açúcares redutores e compostos fenólicos totais, em mg/L.	69
Figura 3.17 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/L) e a concentração de açúcares redutores (mgGLU/g de extrato) para o somatório das frações 1 e 2 obtidas por refluxo.....	70
Figura 3.18 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de café em estudo, com a bactéria <i>S. aureus</i>	71
Figura 3.19 - Resultados obtidos de compostos puros com capacidade antimicrobiana (100mg/mL). 72	
Figura 3.20 - Valores médios de fenólicos totais (mg EAG/L) da fração 1e 2 dos extratos de refluxo originais e dos extratos depois de evaporar o solvente.....	74
Figura 3.21 - Valores médios para a atividade anti-radicalar (mg ET/L) da fração 1 e 2 dos extratos de refluxo originais e dos extratos depois de evaporar o solvente.	75
Figura 3.22 - Energia necessária para a evaporação de um litro de cada uma das misturas de solventes em estudo (Kcal).....	77
Figura 3.23 - Energia por massa de fenólicos totais, para cada extrato obtido na fração 1 de refluxo para os diferentes solventes em estudo.	77
Figura 3.24 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 100% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.	80
Figura 3.25 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 60% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.	80
Figura 3.26 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 50% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.	81

Figura 3.27 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 10% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.	81
Figura 3.28 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 100% água. A - 280 nm; B – 320 nm.....	82
Figura 3.29 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com hidróxido de cálcio 0,01%. A - 280 nm; B – 320 nm.....	82
Figura 3.30 - Valores médios e desvios-padrão para as concentrações dos principais componentes dos extratos de café selecionados para análise em HPLC-DAD.....	83
Figura 3.31 - Valores médios e desvios-padrão para as concentrações dos restantes componentes dos extratos de café selecionados para análise em HPLC-DAD.....	84
Figura 3.32 - Valores médios e desvios-padrão para o teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de extrato) e atividade anti-radicalar (mg ET/g extrato) obtidos no extrato original de 100% água, extrato após digestão gástrica (pH 2) e extrato após a digestão gastrointestinal (pH 6).....	86
Figura 3.33 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato produzido com 100% água após digestão gástrica e digestão gastrointestinal simuladas.. A - 280 nm, digestão gástrica; B – 320 nm, digestão gástrica; C- 280 nm, digestão gastrointestinal; D - 320 nm, digestão gastrointestinal.	87
Figura 3.34 - Evolução dos principais componentes do extrato de café (refluxo, fração 1, 100% água), identificados a 280 e 320 no extrato bruto, digestão gástrica simulada (pH 2) e digestão gastrointestinal simulada (pH 6).	88
Figura 3.35 - Evolução dos compostos identificados a 280 e 320 no extrato bruto, digestão gástrica simulada (pH 2) e digestão gastrointestinal simulada (pH 6).....	89

Lista de abreviaturas

3-ACG (CGA)	ácido 3- <i>o</i> -cafeoilquínico
4-ACG (CGA)	ácido 4- <i>o</i> -cafeoilquínico
5-ACG (CGA)	ácido 5- <i>o</i> -cafeoilquínico
ACG	Ácido clorogénico
ABTS	2,2''-azobis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
Abs	absorvância
AOAC	<i>Official Methods of Analysis Agricultural Chemicals</i>
bh	base húmida
BHA	Hidroxianisol butilado
bs	base seca
BHT	Hidroxitolueno butilado
Ca	Cálcio
C.arábica	Café arábica
C. robusta	Café robusta
cm	centímetro
cv	cultivar
DAD	Detetor de díodos
DNS	Ácido 3,5 - dinitrosalicílico
DPPH	2,2'-difenil -1- picrilhidrazilo
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAC	Equivalente de ácido clorogénico
EAM	Extração assistida por microondas
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ET	Equivalente Trolox
EUA	Estados Unidos de América
FQA	Ácido feruloilquínico
g	grama
HRMS	Espectrometria de Massa de Alta resolução (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GLU	glucose
HCC	Carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
ICO	Organização Internacional de Café (<i>International Coffee Organization</i>)
kg	quilograma
min	minutos
mg	miligrama
mL	mililitro
nm	nanómetro
ppm	partes por milhão
RME	Espectrometria de massa de alta resolução
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOD	Enzima superóxido dismutase
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
λ_{máx}	comprimento de onda máximo

Capítulo 1 - Introdução

1.1 História do Café

Apesar das muitas lendas que existem sobre a sua origem, até à data não se sabe exactamente como se descobriu o café. No entanto, a referência mais difundida é a lenda de Kaldi, na qual um pastor etíope reconhece as qualidades do fruto como fonte de vigor e ânimo. A lenda conta que o pastor descobriu o café depois de perceber que as suas cabras, após ingerirem grãos e folhas de um determinado arbusto (pés de cafeeiro), ficavam tão agitadas que não queriam dormir durante a noite. Depois disto, Kaldi fez questão de transmitir a sua história ao abade do mosteiro local que, por sua vez, fez uma bebida com os grãos e descobriu que esta o manteve alerta durante longas horas de oração à noite. Rapidamente o abade partilhou a sua descoberta com os outros monges do mosteiro e, lentamente, o conhecimento dos efeitos dos grãos começou a espalhar-se sendo que hoje, o café é cultivado numa infinidade de países em todo o mundo e é a segunda maior comodidade transacionável logo a seguir ao petróleo [1][2].

1.2 O cafeeiro

O cafeeiro é um arbusto tropical com folhas verdes, pertencente ao género da família *Coffea* spp *Rubiaceae*, que cresce em áreas de humidade moderada de 600 a 1200 metros. Este género compreende muitas espécies, no entanto, as mais cultivadas são a Arábica e a Robusta, que por sua vez incluem diferentes variedades. O cafeeiro produz um fruto carnudo vermelho ou frutos roxos, chamados cerejas de café, com dois núcleos, cada um contendo um grão ou semente de café verde [3].

No género *Coffea* apenas quatro espécies (*C.arabica*, *C.canephora*, *C.liberica* e *C. Dewevrei* cv.*Excelsa*) têm importância comercial [4]. Outras espécies de café que merecem destaque pelo fato de serem cultivadas nos seus locais de origem e principalmente, por serem fontes importantes de genes para o melhoramento genético são as seguintes: *Coffea bengalensis* Heyne ex Willd; *Coffea eugenioides* S. Moore; *Coffea Stenophylla* G. Don; *Coffea racemosa* Lour; *Coffea congensis* Froenh; *Coffea zanguebariae* Lour, *Coffea abeokutoe* e ainda as espécies da subseção *Mascharocoffea*, dos cafés descafeinados [5].

1.2.1 Cultivares de *Coffea arabica*

A espécie arábica é mais importante do género *Coffea* e corresponde a cerca de 70% do café comercializado mundialmente. Esta espécie é nativa das terras altas da Etiópia, antiga Abissínia, sendo atualmente cultivada no continente americano, África e Ásia e dá origem a uma bebida de qualidade superior, de aroma marcante e sabor adocicado, largamente consumida pura ou em misturas com outras espécies de café [6]. De entre as espécies do género *Coffea* já descritas, *C. arabica* é a única tetraplóide, sendo as demais diplóides. Isso significa que a *C. arabica* possui quatro conjuntos do

número básico de cromossomas do género ($n=11$), totalizando 44 cromossomas. Quanto ao modo de reprodução, *C. arabica* é autogâmica, o que significa que a sua reprodução ocorre principalmente por meio de autofecundação, chegando a ter 90% das suas flores fertilizadas pela junção de pólen e óvulos oriundos da mesma planta [6].

1.2.2 Cultivares de *Coffea canephora*

Café robusta é uma denominação generalizada que agrupa as variedades da espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. É uma espécie nativa das florestas baixas da África Equatorial na bacia do rio Congo e atualmente é cultivada em alguns países da África Central e Ocidental, no sudeste da Ásia e na América do Sul. A sua utilização é mais comum na preparação de misturas (*blends*), nas quais é misturada ao café arábica, podendo compor até 30% do produto final. Por possuir maior teor de sólidos solúveis que o café arábica e apresentar maior rendimento após o processo de torrefação, o café robusta é a componente essencial dos cafés solúveis [7].

As plantas da espécie *Coffea canephora* são arbustos muito ramificados com um desenvolvimento inicial mais lento do que o *Coffea arabica*. Quando atingem a maturidade apresentam copas mais desenvolvidas e um porte mais elevado [6].

Na tabela 1.1 encontram-se as principais características e requerimentos para o cultivo de café, das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

Tabela 1.1 - Características e requerimentos para o cultivo de café (adaptado de [8])

Características das espécies	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Estado do cromossoma	Anfidiplóide ($2n=4x=44$ cromossomas)	Diplóide ($2n= 22$ cromossomas)
Ecologia	Húmido, bosque tropical de folhas perenes (cultivo com e sem árvores de sombra, cultivo intercalado)	
	Montanhas tropicais (950-) 1200-1950 m	Zonas tropicais baixas (50-) 250-1500 m
Temperatura	Moderada, 15-24 °C	Caloroso, 18-36 °C
Chuva	1200-2200 mm ano ⁻¹ Cultivos excepcionais ao nível do mar (Havai)	2200-3000 mm ano ⁻¹ Às vezes em floresta seca húmida sazonal.

(Tabela 1.1 continuação)

Características das espécies	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Altura da planta	4 a 6 m (poda 2 a 3m)	8 a 12 m (poda 2 a 3 m)
Diâmetro do dossel	1,2 a 2 m	1,2 a 2 m
Sistema Radicular	Raiz principal 0,5 a 1 m ; várias raízes axilares, profundidade vertical 1,5 a 3 m; muitas raízes laterais paralelas ao solo, distância 1,5 a 1,8 m do tronco, raízes de cabelo em geral.	
	Raízes mais profundas	Raízes menos profundas
Folhas	Elíptica, margem inteira; verde escuras a verde bronze.	
	Comprimento 10 a 15 cm	Comprimento 20 a 35 cm
	Largura 4 a 6 cm	Largura 8 a 15 cm
	Tempo de crescimento: 7 a 8 semanas para expansão completa e fotossíntese ótimas	Vida útil 7 a 10 meses
Inflorescência	Emparelhado, axilar, melhor floração em madeira de 1 ano de idade, tempo de crescimento de 4 meses com períodos de dormência	
	4 a 12 nós com 16 a 48 flores por nó	30-100 flores por nó

(Tabela 1.1 continuação)

Características das espécies	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Flores	Hermafrodita, corolas brancas e raramente rosa claro, lóbulos de la corola se sobrepõem, estilo longo	
	Autogâmicas (autopolinização)	Alogâmicas (polinização cruzada)
	Tempo de polinização 1 dia	Recetivo até 6 dias após a floração
Fruto	As bagas contêm duas sementes (raramente uma ou três), assim como sementes com sulco profundo	
	Comprimento 12 a 18 mm	Comprimento 8 a 16 mm
	Maturação do fruto 7 a 9 meses após da fluorescência	Maturação do fruto 9 a 11 meses após da fluorescência

1.3 Composição química de grãos de café verde

O café é considerado uma das bebidas mais complexas do ponto de vista da sua química. Esta complexidade resulta não apenas do grande número de compostos químicos contidos nos grãos de café verde, mas também das transformações sofridas por estes compostos em todas as fases do processamento do grão e da extração do café, originando uma grande diversidade de estruturas complexas que se podem encontrar numa chávena de café [8].

Tal como a maioria dos tecidos vegetais, os grãos de café verde são compostos principalmente por polissacáridos insolúveis, como celulose e hemiceluloses (cerca de 50% m/m). Contêm também hidratos de carbono solúveis, tais como os monossacáridos frutose, glucose, galactose e arabinose, os oligossacáridos de sacarose (que representam mais de 90% dos oligossacáridos), rafinose e estaquiose e polímeros de galactose, manose, arabinose e glucose. Os hidratos de carbono solúveis atuam fixando o aroma, estabilizando a espuma, sedimentando e aumentando a viscosidade do extrato. Além disso, também estão presentes ácidos alifáticos não voláteis (tais como os ácidos cítrico, málico e quínico) e ácidos voláteis (tais como ácidos acético, propanóico, butanóico, isovalérico, hexanóico e decanóico). Os óleos e ceras são também constituintes importantes, representando 8 a 18% da massa seca. A cafeína é o principal alcalóide dos grãos de café, representando 1 a 4% (m/m em base seca), com grande variação da sua concentração entre os diferentes cultivares [9] [10] [11].

A composição de grãos de café verde varia de acordo com as espécies, origem e os métodos de análise. Os principais componentes dos géneros *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta) em grãos de café verde são apresentados na tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Os principais componentes dos grãos de café verde (% m/m em base seca) [12].

Componentes	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Cafeína	0,6 – 1,5	2,2 – 2,8
Trigonelina	1,0	0,7
Ácido clorogénico (ACG)	5,2 – 6,4	5,5 – 7,2
Ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico	0,7 - 1,0	1,4 - 2,5
Ácido O- feruoilquínico	0,3 – 0,5	0,5 - 1,5
Outros ácidos orgânicos	~2,0	~2,0
Sacarose e outros açúcares redutores	5,3 – 9,3	3,7 – 7,1
Flavana	9,0– 13,0	6,0– 8,0
Manana	25,0– 30,0	19,0– 22,0
Galactano	4,0– 6,0	10,0 -14,0
Outros polissacáridos	8,0 -10,0	8,0 -10,0
Aminoácidos livres	0,4 -2,4	0,8 – 0,9
Proteínas	~12,4	~12,0
Kahweol	0,7 – 1,1	n.d
Ácidos gordos	10,0– 14,0	8,0– 10,0
Outros lípidos	~2,0	~4,0
Mineral	~4,0	~4,0
Total	91,0– 114,0	86,0– 107,0

n.d-Não detetado.

A composição do café varia com a espécie, com o processamento do grão e com o processo de produção da bebida. Na tabela 1.3 apresenta-se uma visão geral dos dados analíticos dos constituintes principais do café em grão (verde e torrado) e do café solúvel das duas espécies mais utilizadas comercialmente. Apesar de alguns componentes existirem em quantidades mais pequenas, podem dar um contributo importante para o aroma e o sabor do café.

Tabela 1.3 - Composição química do café (% m/m, base seca) [13].

Constituinte	Arábica verde	Robusta verde	Arábica torrado	Robusta torrado	Arábica instantâneo	Robusta instantâneo
Cafeína	1,3	2,3	1,3	2,4	2,5	3,8
Trigonelina	0,8	0,7	0,3	0,3	0,7	0,4
Carboidratos hidrolatados de carbono	53,7	50,7	38	42	46,6	44,7
Ácidos Clorogénicos	8,1	9,9	2,5	3,8	2,6	1,6
Lípidos	15,2	9,4	17,0	11,0	0,11	0,26
Aminoácidos	11,1	11,8	7,5	7,5	6,2	6,0
Ácidos orgânicos	2,3	1,7	2,4	2,6	8,1	7,9
Melanoidinas	-	-	25,4	25,9	25,1	28,6
Aroma volátil	Traços	Traços	0,1	0,1	-	-
Cinza (minerais)	3,9	4,4	4,5	4,7	8,0	7,4
Outros	-	-	melanoidina	melanoidina	-	-

1.4 Processamento do café

Existem dois tipos de processamento das cerejas de café, de forma a obter café verde: o processo húmido ou o processo seco. O processo seco é tecnologicamente mais simples e é geralmente utilizado para o café robusta. Neste processamento, os grãos de café são secos ao sol e posteriormente descascados. A pele, polpa, mucilagem, pergaminho e parte da pele prateada são removidos durante o descasque [9].

No processo húmido, mais utilizado para o café arábica, os grãos maduros e os grãos verdes são separados por imersão em água, observando-se que os grãos maduros se afundam enquanto os grãos verdes flutuam. Este processamento envolve diversas etapas incluindo fermentação microbiana, o que confere ao café melhores qualidades aromáticas. Posteriormente, separam-se a polpa e a pele por moagem [14].

A torrefação do café é um processo complexo no qual o café é exposto a temperaturas até 300 °C, ocorrendo diversas modificações físicas e químicas no grão, e formando-se os compostos voláteis de grande importância para o sabor e aroma do café [15]. Este processo envolve reações de Maillard, Streckler, pirólise e hidrólise, durante as quais aminoácidos, açúcares, trigonelina e ácidos clorogénicos são convertidos em furanos, pirazinas, piridinas e outros compostos azotados e sulfurados [15][16].

Os diferentes processamentos de café e os respetivos sub-produtos ou resíduos produzidos em cada um deles encontram-se esquematizados na figura 1.1.

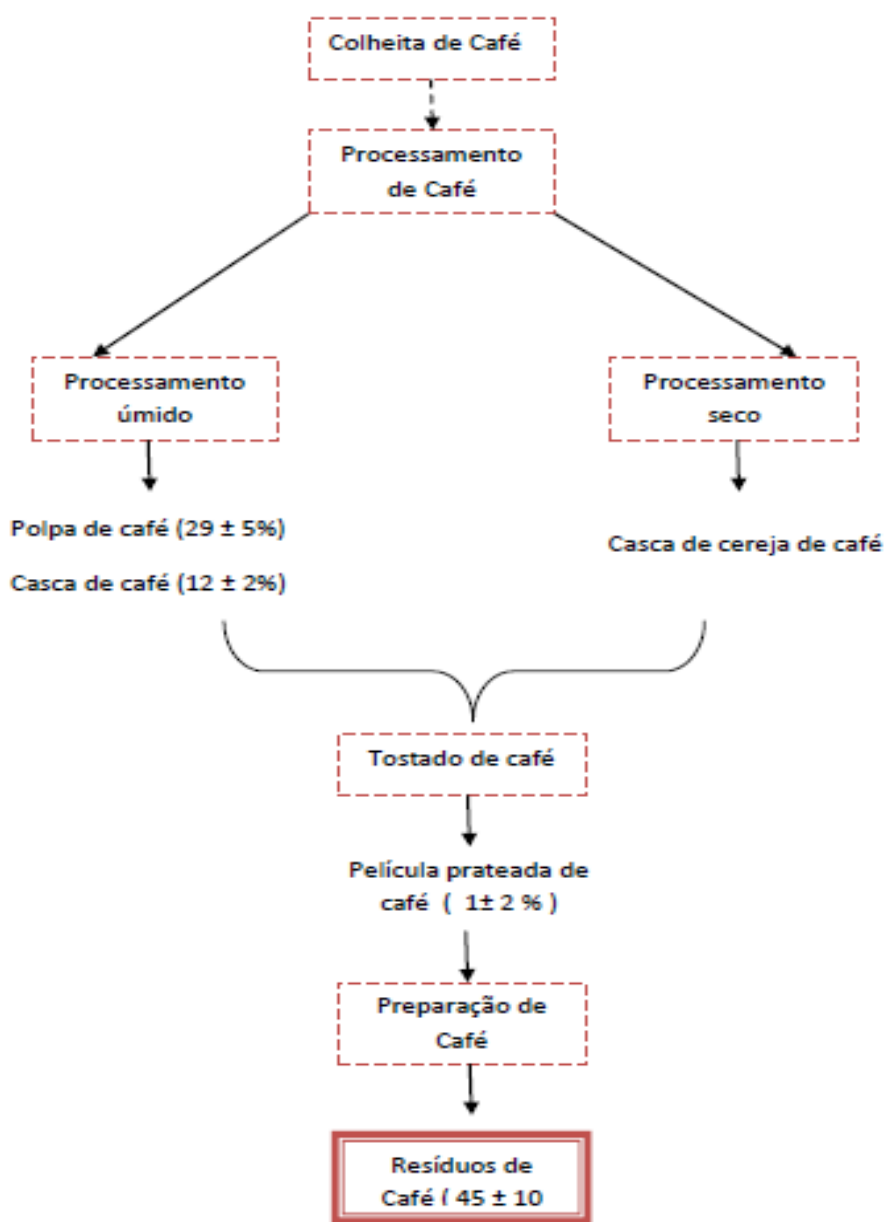


Figura 1.1 - Obtenção de subprodutos de café (adaptado de [14]).

Ambas as tecnologias de processamento dão origem a subprodutos, maioritariamente polpa e casca. Por outro lado, o processo de torrefação que é geralmente aplicado ao café dá origem a um subproduto designado por película prateada.

1.5 Subprodutos e resíduos da indústria do café

O café é uma das principais matérias-primas produzidas e comercializadas em todo o mundo, sendo o segundo maior bem transacionável a seguir ao petróleo [17][18]. De acordo com a *International Coffee Organization* (ICO), no ano de 2015 em Portugal foram consumidos 4,8 kg de café *per capita*. Em termos de importações no mesmo ano, Portugal importou cerca de 814355 sacos de 60 kg de café verde, 16972 sacos de 60 kg de café torrado e 82237 sacos de 60 kg de café solúvel [19].

Na tabela 1.4 apresentam-se os valores para a produção global de café entre 2013 e 2016:

Tabela 1.4 – Produção total de café por continente exportador, em milhares de sacos de 60 kg (adaptado de [19]).

	2013	2014	2015	2016
África	16243	15987	16229	16353
Ásia e Oceânia	46461	45666	48967	43110
América Central	16598	17116	17291	17740
América do Sul	72828	69954	68951	74420

A principal consequência da produção e consumo destas quantidades de café, é a enorme quantidade de subprodutos e resíduos gerados. De acordo com Rodríguez e Zambrano (2010), cerca 70% da biomassa das cerejas de café é considerada resíduo [20], pois apenas o grão, que corresponde a cerca de 30% da massa é valorizado na indústria alimentar (Figura 1.2).

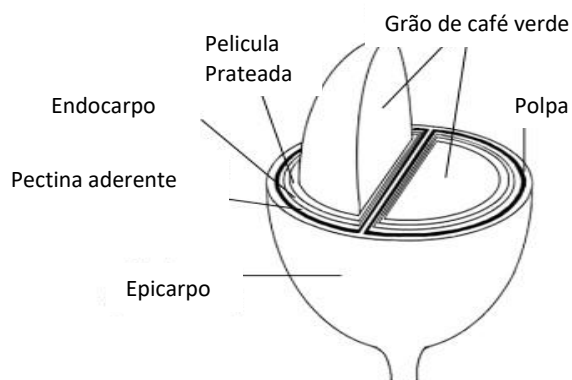


Figura 1.2 - Secção transversal da cereja de café (adaptado de [21]).

Na produção de café solúvel, uma tonelada de café verde gera cerca de 650 kg de borras de café [22] e tendo em conta que 50% da produção mundial de café corresponde a café solúvel, são geradas cerca de 6 milhões de toneladas de borras de café por ano [23].

A produção de grãos de café verde comercializáveis dá assim origem a vários subprodutos, dependendo do método de processamento seguido. O principal subproduto do processamento a seco é composto pela pele, polpa, mucilagem e pergaminho, todos juntos numa única fração (casca de café). Por outro lado, o processamento húmido permite recuperar a pele e a polpa numa fracção de 43,2% m/m da massa total, a mucilagem e os açúcares solúveis numa segunda fracção de 11,8% m/m da massa total (se não for utilizada fermentação), e finalmente, o pergaminho numa terceira fracção correspondente a cerca de 6,1% m/m da massa total [21].

1.5.1 Polpa e casca de café

Entre os subprodutos da indústria do café, a polpa é o principal obtido durante o processamento húmido e semi-seco, representando 29% do peso seco de toda a baga [14][24]. As cerejas de café fresco contêm mais de 430 g de polpa por quilograma [25], fracção essencialmente rica em hidratos de carbono, proteínas e minerais (especialmente potássio) e que também contém quantidades apreciáveis de taninos, polifenóis e cafeína. Os componentes orgânicos presentes na polpa de café (peso seco) incluem taninos 1,80-8,56%, substâncias pécicas 6,5%, açúcares redutores 12,4%, açúcares não redutores 2,0%, cafeína 1,3%, ácido clorogénico 2,6% e ácido cafeico 1,6 % [25]. Valores médios para os diferentes componentes da polpa de café são apresentados na tabela 1.4.

De acordo com Mussato e colaboradores (2011), a polpa de café e as águas residuais do café contêm quantidades consideráveis de açúcares fermentáveis e outros nutrientes. Estes constituem substratos interessantes para o crescimento de microrganismos e também para a produção de produtos de valor acrescentado tais como bioetanol e compostos aromáticos voláteis [26].

Foi demonstrado que a polpa da cereja de café é uma fonte potencial de antioxidantes, como os compostos fenólicos, que não devem ser desperdiçados. Dado que a polpa da cereja do café e os feijões de café contêm componentes similares, a polpa seca da cereja do café pode ser usada para produzir uma bebida refrescante e estimulante chamada cáscara (palavra espanhola para a casca), uma infusão de polpa seca de cereja de café [27].

As cascas de café processadas a seco têm um conteúdo de humidade entre 7% a 18%, dependendo das condições de processamento e armazenamento. Valores médios para a composição química de cascas de café são apresentados na tabela 1.4.

As cascas são ricas em matéria orgânica e nutrientes e contêm compostos tais como cafeína, taninos e polifenóis. A cafeína está presente em cascas de café a 1,3% da sua concentração (base seca) [28].

Tabela 1.4 - Composição química de cascas e polpa de café obtidos em processos seco e húmido (adaptado de [29]).

	Cascas de café (processo seco)	Polpa de café (processo húmido)
Proteína	8-11	4-12
Lípidos	0.5-3	1-2
Minerais	3-7	6-10
Hidratos de carbono	58-85	45-89
Cafeína	~1	~1
Taninos	~5	1-9

1.5.2 Película prateada (*silverskin*)

A película prateada, ou *silverskin*, representa cerca de 4,2% (m/m) do grão de café e é o principal subproduto do passo de torrefação. Este resíduo inclui fibra dietética (50-60%), proteína (16-19%), gordura (1,56-3,28%) e cinzas (7%) [21], sendo que os principais componentes da película são celulose e hemiceluloses [30].

De acordo com Fernández-Gomez e colaboradores (2016), os extratos da película prateada do café são fonte natural de compostos bioativos, como ácido clorogénico, cafeína, melanoidinas e fibras alimentares, entre outros, com supostos benefícios para a saúde [31].

No trabalho de Borrelli e colaboradores (2004) relata-se que em extratos obtidos a partir da película prateada de café com metanol, foi encontrada uma capacidade significativa de captação de radicais ABTS (2,2'-azobis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico). Os mesmos autores atribuíram a esses extratos atividades prebióticas, nomeadamente a indução do crescimento de *Bifidobacterias* spp, e destacaram o seu elevado teor de fibra dietética solúvel [32].

1.5.3 Borrás de café (*spent coffee grounds*)

O grão de café torrado e moído é extraído com água quente para preparar o café bebível, resultando deste processo um resíduo denominado “borra de café”, composto principalmente por sólidos insolúveis mas contendo ainda quantidades significativas de água [9]. A produção de quantidades extremamente significativas destes resíduos perecíveis conduzem à necessidade de elaboração de planos de gestão adequados. Por exemplo, a empresa Nestlé comprometeu-se a reduzir a sua produção de resíduos a zero até 2020. Algumas fábricas da Nestlé na Europa já atingiram este objetivo, sendo que as borras de café são utilizadas como fonte de energia renovável, na produção de *pellets* ou briquetes [33].

Devido à sua composição rica em açúcares, este resíduo da indústria do café, tem sido bastante estudado relativamente à sua utilização para a produção de bioetanol com recuperação de ácidos clorogénicos [34], ou para a produção de açúcares e bioetanol [35]. Por outro lado, existem ainda

quantidades significativas de compostos fenólicos nas borras de café e a sua extração tem sido abordada em diversos estudos [36][22][37] devido ao elevado valor acrescentado destes compostos em diversas áreas industriais.

A exploração deste resíduo como fonte de produtos de valor acrescentado passa também pela sua utilização na produção de biodiesel [38][39], biogás [40], como precursor de carvão ativado [41][42] e em compostagem [43].

Na tabela 1.5 encontra-se um resumo de diferentes aplicações estudadas para os diferentes subprodutos da indústria do café referidos neste trabalho.

Tabela 1.5 - Aplicações dos principais subprodutos da indústria do café.

Subprodutos	Aplicação	Referência
Casca	Biopesticidas para mosquitos	[44]
Polpa	Produção de ácido láctico fermentado; Produção de Bioetanol.	[45] [46]
Película prateada	Extratos da película como melhoradores da secreção de insulina; Produção de pão.	[47] [48]
Borras de café	Fertilizante de solo; Adsorventes catiónicos em tratamentos de águas residuais; Produção de bebidas alcoólicas; Produção combustível líquido a partir de óleo de café moído.	[49] [50] [51] [52]

1.5.4 Café “rejeitado” – Critérios de qualidade

No processo produtivo do café, alguns grãos são considerados “defeituosos” por não corresponderem aos critérios de qualidade estabelecidos para o produto final. A qualidade é o resultado de diversos factores na produção e processamento do café, sendo que os critérios de maior importância são:

- Origem do produto;
- Variedade do café (arábica, subvariedades de arábica, robusta, etc.);
- Gestão agronómica correta;
- Processos de colheita e pós colheita;
- Processos industriais de processamento do grão.

Os atributos dos grãos de café estão relacionados com as suas qualidades intrínsecas tais como, teor de humidade, cor, tamanho ou defeitos físicos, características de grande impacto no valor e na qualidade do café. Por outro lado, estes atributos associados ao processo de torrefação podem fazer variar os atributos sensoriais característicos do café, nomeadamente, aroma, sabor, acidez e adstringência [53].

Os grãos de café “defeituosos” são amplamente conhecidos por afetar negativamente a qualidade da bebida. Os grãos de café eliminados na triagem representam cerca de 15-20% da produção de café em base de peso, o que constitui uma quantidade significativa de material que deve ser destruído ou valorizado de outra forma [54]. Quase 1,2-1,5 milhões de toneladas de grãos rejeitados são geradas na indústria do café, pois os cafés de baixa qualidade são rejeitados no mercado internacional devido ao sabor indesejável produzido na bebida [55]. A *International Coffee Organization* (ICO) acredita que os consumidores irão recorrer a bebidas alternativas se os produtores continuarem a usar grãos de baixa qualidade na fabricação da bebida, dado que em certos casos os grãos de baixa qualidade não são descartados, mas sim incorporados em misturas com grãos de boa qualidade [56].

Por essa razão, atualmente, os grãos de café sem qualidade são quase sempre descartados antes da comercialização, sendo necessário encontrar maneiras e meios alternativos para a sua valorização.

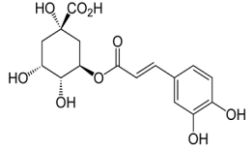
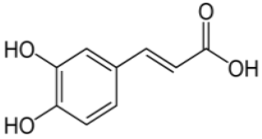
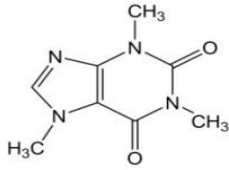
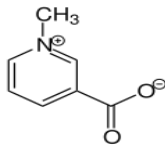
Oliveira e colaboradores (2006) estudaram a composição aproximada de grãos de café rejeitados e a composição química do óleo desses grãos de forma a obter informação relevante para possíveis vias de utilização destes resíduos. De acordo com este estudo, os grãos de café rejeitados não apresentaram diferenças significativas do teor de proteína relativamente aos grãos de boa qualidade mas apresentaram um teor de lípidos inferior, bem como diferenças ao nível do teor de cinzas. Por outro lado, não foram observadas diferenças na composição de ácidos gordos entre os dois tipos de café, pelo que os autores concluíram que o óleo e os sólidos residuais produzidos a partir de grãos rejeitados podem ser utilizados em formulações para as indústrias alimentar e farmacêutica, depois de um processamento mínimo [54].

Outro trabalho relativo às potencialidades dos grãos de café rejeitados foi publicado por Ramalakshmi e colaboradores (2008), que estudaram a extração de grãos de café defeituosos com diferentes solventes. O maior rendimento de extrato foi obtido com metanol (12%) e este extrato exibiu atividades anti-radicalar e antioxidante bastante significativas (92,5 e 58% respetivamente). Os autores validaram também a presença de compostos fenólicos e ácidos clorogénicos, afirmando que extratos preparados com café rejeitado são fontes adequadas de antioxidantes fenólicos, passíveis de utilização em sistemas alimentares dependendo de mais estudos [57].

1.6 Componentes funcionais do café

Nas últimas décadas, o café tem sido amplamente reconhecido como uma importante fonte de antioxidantes, com provas crescentes que reforçam o seu potencial de promoção da saúde dos consumidores regulares [58]. Tal como descrito no ponto 1.3 deste trabalho, os grãos de café contêm uma diversidade de compostos bioativos que podem interagir com o corpo humano de uma maneira complexa, originando muitos resultados benéficos (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 – Designação e estruturas químicas dos principais compostos bioativos do café (adaptado de [59][60]).

Composto	Sinónimo (Número CAS)	Estrutura química
Ácido Clorogénico $C_{16}H_{18}O_9$	5-o-ácido cafeoilquínico (327-97-9)	
Ácido Cafeico $C_9H_8O_4$	Ácido 3,4- dihidroxicinâmico (331-39-5)	
Cafeína $C_8H_{10}N_4O_2$	Metilteobromina (58-08-2)	
Trigonelina $C_7H_7NO_2$	Cafearina (535-83-1)	

Reconhece-se que os efeitos benéficos do consumo de café estão relacionados com o seu alto teor de antioxidantes, como os ácidos clorogénico, ferúlico, cafeico e cumárico presentes nos grãos de café verde e também as melanoidinas que se formam nos grãos de café torrados, sendo os ácidos clorogénico e cafeico considerados os marcadores mais relevantes de atividade antioxidante em amostras de café [58].

1.6.1 Antioxidantes

Os compostos antioxidantes desempenham um papel crucial na prevenção ou minimização do stresse oxidativo, pelo que têm atraído muita atenção como aditivos alimentares. Tanto os antioxidantes sintéticos como os naturais são amplamente utilizados em produtos alimentares, e o interesse nestes últimos tem crescido à medida que surgem dúvidas sobre a segurança alimentar de antioxidantes sintéticos.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias: os enzimáticos, que fazem parte do nosso sistema de defesa antioxidante endógeno e são enzimas que sequestram e neutralizam as espécies reativas de oxigénio (ROS), e os não enzimáticos, que são moléculas orgânicas ou elementos minerais provenientes da dieta ou dos nossos processos metabólicos, que interagem com as ROS, ou com os compostos que intervêm na sua formação, transformando-os em moléculas mais estáveis e portanto com menos tendência para provocar a oxidação das biomoléculas [61]. A figura 1.3 representa um esquema simplificado de classificação dos compostos antioxidantes.

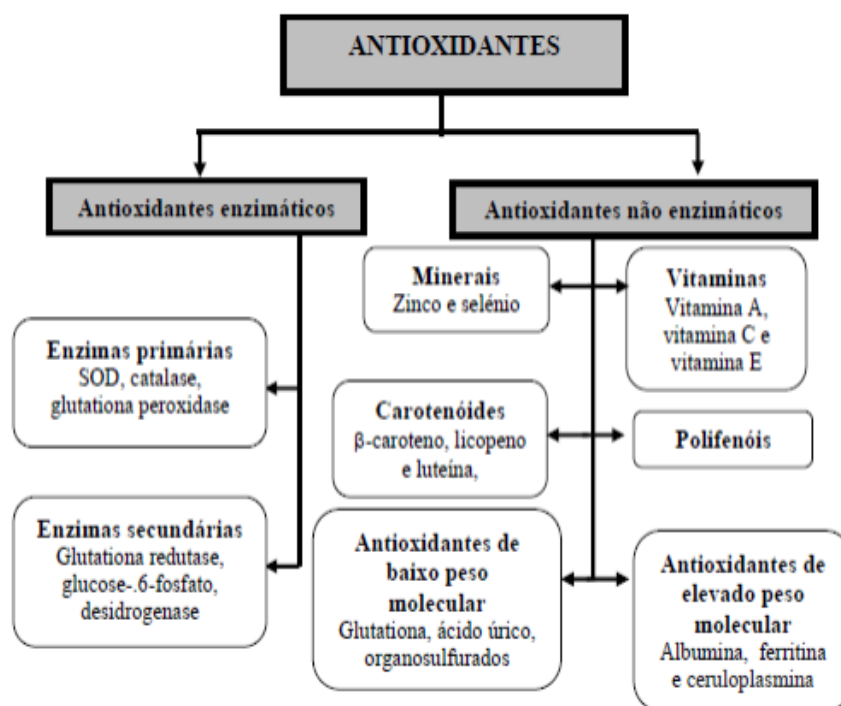


Figura 1.3 - Classificação dos antioxidantes (adaptado de [62]).

Os compostos fenólicos podem reduzir as reacções oxidativas em alimentos submetidos a tratamentos, tais como a radiação gama e pasteurização, bem como durante o armazenamento a longo prazo, o que pode afetar o seu tempo de vida e as suas características sensoriais [63][64]. Os compostos fenólicos estão presentes nos produtos naturais em formas solúveis (livre e esterificada) e insolúveis, dependendo

a proporção de cada forma não só do material de partida, mas também do seu cultivar e do eventual processamento ao qual a matéria-prima é sujeita [65].

Além das capacidades antioxidantes os compostos fenólicos também podem apresentar atividades antimicrobiana, anti-mutagénica, anti-inflamatória, anti-alérgica e anti-tumoral; a sua capacidade de eliminar ou neutralizar as ROS pode minimizar processos inflamatórios e inibir a expressão de fenótipos agressivos de cancro, exibindo potencial para a quimioprevenção, reduzindo a genotoxicidade e abrandando a progressão do cancro [66][67].

A produção inevitável de radicais livres pelo organismo, com a consequente exposição celular aos mesmos, fez com que, adaptativamente, os organismos tenham vindo a desenvolver mecanismos de defesa (intra e extracelulares), que lhes permitem salvaguardar o equilíbrio de que necessitam para o funcionamento celular normal, minimizando os efeitos nefastos causados pelo excesso de agentes oxidantes [68].

Além disso, estudos recentes confirmam que uma das principais causas para o envelhecimento precoce e doenças perigosas como o cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) [69] ou a diabetes é a acumulação excessiva de produtos derivados de reações de oxigénio e azoto, tais como anião superóxido, o radical hidróxilo e o radical hidroperóxido [70]. Apesar dos seus efeitos benéficos, os antioxidantes naturais são facilmente oxidados e frequentemente sensíveis ao calor, à luz e ao pH do meio, o que limita sua aplicação em diversas vertentes industriais, em particular na indústria alimentar [71].

Os antioxidantes naturais estão presentes em alimentos como vegetais, frutas, grãos e outros produtos alimentícios que fazem parte da vida quotidiana das pessoas, tal como o café.

1.6.2 Perfil de componentes fenólicos

Existem, aproximadamente, 5000 polifenóis com atividade antioxidante comprovada, embora com grandes variações de eficiência entre os diferentes compostos. Tal como referido anteriormente, os compostos fenólicos possuem inúmeros efeitos biológicos, sendo que extratos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais vegetais ricos em fenólicos, despertam cada vez mais o interesse na investigação e na indústria. Estes compostos podem ser classificados em grupos diferentes em função do número de anéis fenol que contêm e dos elementos estruturais que ligam esses anéis. Assim sendo, é possível agrupar os compostos fenólicos em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos [66].

A eficácia dos antioxidantes fenólicos, depende do número e da posição dos grupos hidróxilo ligados ao anel aromático, do tipo de substituintes e do seu local de ligação, da posição relativa dos grupos ligados e da sua habilidade para estabilizar e deslocalizar electrões desemparelhados no anel aromático [72]. Na tabela 1.7 encontram-se descritas diferentes classes e subclasses de compostos fenólicos presentes em plantas superiores, organizadas de acordo com a sua estrutura carbonada.

Tabela 1.7 - Classes de compostos fenólicos de ocorrência natural em plantas superiores (adaptado de [73]).

Número de átomos de carbono	Estrutura básica	Classe
6	C ₆	Fenóis simples, benzoquinonas
7	C ₆ - C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ - C ₂	Acetofenona, ácido fenilacético
9	C ₆ - C ₃	Ácidos hidroxicinâmicos, polipropeno, coumarina, isocoumarina
10	C ₆ - C ₄	Naftoquinona
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Xantona
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	Estilbenos, antraquinona
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavonóides, isoflavonóides
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignanos, neolignanos
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Biflavonóides
n	(C ₆ - C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ - C ₃ - C ₆) _n	Ligninas, catecolmelanina (taninos condensados)

1.6.2.1 Ácidos clorogénicos

Os compostos fenólicos maioritariamente encontrados em grão de café verde correspondem a ácidos clorogénicos (ACG), até cerca de 12% de sólidos. Também conhecidos como ácidos cinamoilquínicos, estes derivados de ácidos são uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e um ou mais ácidos cinâmicos (ácidos cafeico, ferúlico e *p*-coumárico) [74] [29].

O ácido clorogénico mais comum é o ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-ACG ou ácido clorogénico). No entanto, muitos outros isómeros estruturais estão presentes em plantas, tais como o ácido 3-*o*-cafeoilquínico (ácido 3-ACG ou ácido neoclorogénico) e ácido 4-*o*-cafeoilquínico (ácido 4-ACG ou ácido criptoclorogénico) (Figura 1.4) [75] [29].

O café representa a maior fonte dietética de 5-ACG e de outros ácidos clorogénicos [76], no entanto, os ácidos clorogénicos podem ser encontrados noutras matrizes alimentares, nomeadamente, maçã, pêra, beringela, tomate, morango, batata, alface, espinafre, feijão de soja, cacau, erva-mate, chás verde e preto

[77][78][79][80][29]. Estes compostos também se encontram presentes em biomassa lenhocelulósica como bambu ou espinheiro branco [81].

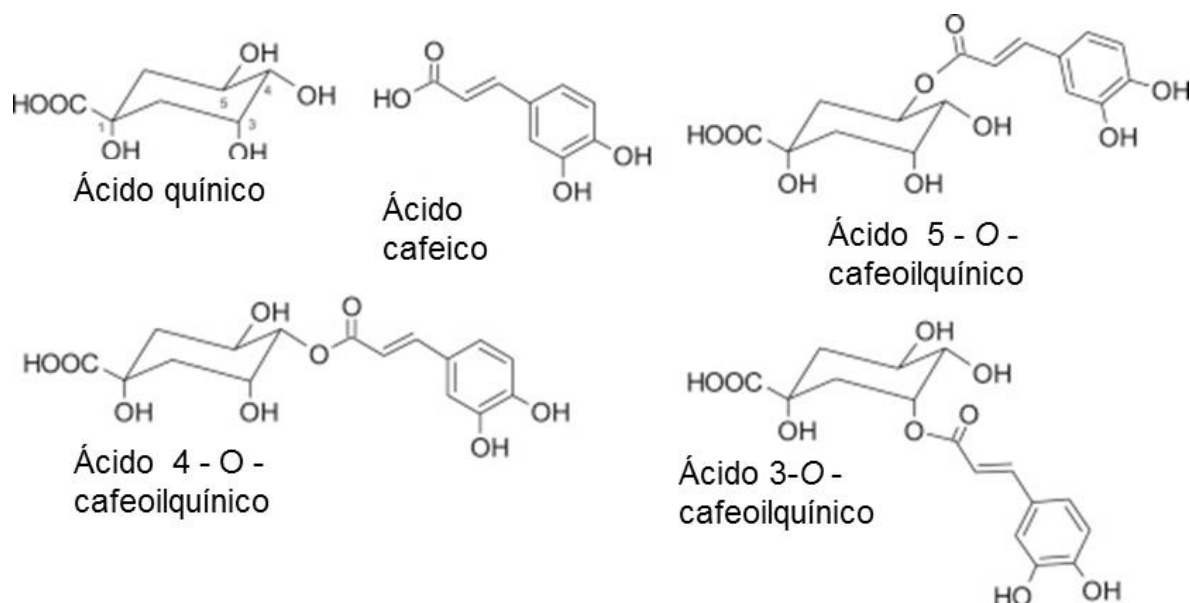


Figura 1.4 - Estruturas e nomenclatura dos ácidos clorogênicos comuns e dos seus blocos de construção, ácido quínico e ácido cafeico (adaptado de [75]).

De acordo com Clifford (1999), estima-se que 200 mL de café (torrado e moído) possam fornecer desde 20 mg (café suave com grau de torrefação elevado) até 675 mg de ACG (café forte robusta com grau de torrefação baixo) [29].

Os ácidos clorogênicos são compostos de extremo interesse, dado que têm aplicações potenciais como conservantes de alimentos ou para utilização em vários tratamentos médicos [37], apresentando propriedades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antiviral ou antitumoral [76]

Existem diversos trabalhos acerca dos efeitos de ACG no organismo humano a diversos níveis, sendo de destacar o trabalho de Mikami e Yamazawa (2015) que investigaram os efeitos protetores do ACG na morte neuronal induzida por glutamato, utilizando culturas de córtex cerebral de ratos, dado que a libertação de glutamato durante a isquémia cerebral desencadeia a morte de neurónios. Os autores verificaram que o ACG inibiu a morte neuronal induzida e preveniu o aumento de concentrações intracelulares de Ca^{2+} causadas pela adição de glutamato aos neurónios em cultura [82].

Xu e colaboradores (2012) investigaram e compararam os perfis das atividades antioxidante e protetora de ADN de isómeros de ácido cafeoilquínico, 3-ACG, 4-ACG e o 5-ACG, e três isómeros de ácido dicafeoilquínico. Os autores concluem que, no geral, os ácidos dicafeoilquínicos possuem melhores atividades antioxidantes, maioritariamente porque possuem mais grupos hidróxilo que os ácidos cafeoilquínicos, cujos três isómeros estudados apresentam atividades antioxidantes semelhantes [83].

De acordo com Yan e co-autores (2017), pacientes com hepatite viral que bebiam café todos os dias, experienciaram uma redução na incidência de carcinoma hepatocelular (HCC). Assim sendo, os autores

avaliaram os efeitos de ácido clorogénico no HCC e verificaram que o ácido clorogénico inibe a proliferação de células HepG2 e apresenta também a capacidade de induzir a inativação e/ou supressão na expressão de genes envolvidos no mecanismo do HCC. Os dados destes autores demonstram que os ácidos clorogénicos são agentes promissores na prevenção da progressão de HCC [76].

Além dos trabalhos descritos acima, os ácidos clorogénicos são também investigados e utilizados na área da dietética. Cho e colaboradores (2010) investigaram a eficácia do ácido clorogénico em alterar a gordura corporal de ratos obesos numa dieta rica em gordura (37% calorias de gordura), comparando com a eficácia do ácido cafeico. Ambos os ácidos foram suplementados numa concentração de 0,02% (m/m) e ambos diminuíram consideravelmente o peso, a massa gorda visceral e os níveis de leptina plasmática e insulina nos ratos. Os autores também verificaram decréscimo nas concentrações de triglicéridos (no plasma, fígado e coração), bem como do colesterol (no plasma, tecido adiposo e coração). Os autores concluíram que o ácido clorogénico se mostrou mais potente na redução de peso corporal e na regulação do metabolismo dos lípidos, que o ácido cafeico [78].

1.6.3 Cafeína

A cafeína (Figura 1.5) ou 1,3,7-N-trimetilxantina é um alcalóide que se encontra naturalmente em plantas, como folhas de chá, sementes de café, nozes de cola e grãos de cacau [84]. A molécula foi isolada pela primeira vez pelo químico alemão Friedrich Ferdinand Runge em 1819.

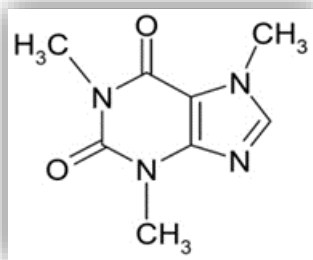


Figura 1.5 - Estrutura química da cafeína.

A cafeína pode ser detetada em vários tipos de alimentos e bebidas que consumimos quotidianamente, sendo maioritária no café. Relativamente ao café, a biossíntese da cafeína ocorre nas folhas e no pericarpo (parte externa do fruto), embora nas primeiras o teor seja baixo. Nos tecidos do pericarpo, a luz estimula fortemente a etapa de metilação da síntese de cafeína. Quando a semente dentro do fruto começa a crescer, o alcalóide é translocado através das membranas e acumula-se no endosperma. Aqui, a concentração final é alcançada 8 meses após a floração [13].

Este composto faz com que vários efeitos fisiológicos ocorram, tais como o relaxamento da musculatura brônquica, a estimulação do sistema nervoso central e a secreção de ácido gástrico [85].

Segundo o relatado por Mitchell e colaboradores (2014), 85% da população dos EUA ingere pelo menos uma bebida contendo cafeína por dia [86]. O café arábica pode ter entre 36 a 112 mg de cafeína por 100 mL de café, já o café robusta pode variar entre 56 e 203 mg de cafeína por 100 mL de café. As concentrações de cafeína podem apresentar uma variação muito ampla: o mesmo tipo de grão de café produzido da mesma maneira pode conter níveis de cafeína que variam de 130 a 282 mg por 240 mL de café [87].

A extração de cafeína foi abordada em vários trabalhos, como o de Spiro e Hunter (1995), que estudaram a extração de cafeína a partir de grãos de café verdes e torrados. Os autores concluíram que a presença de cafeína diminui significativamente (até 40%) com um tratamento térmico suave e que um tratamento severo reduz mais 30%, demonstrando assim o efeito da torrefação sobre o conteúdo deste alcalóide [88].

A variação do teor de cafeína, influenciado por vários métodos de preparação de café, foi estudado por Bell e colaboradores (1996), que concluíram que volumes maiores de café preparados a uma proporção constante de sólidos de café para água, produziram conteúdos de cafeína significativamente mais elevados [89].

Entretanto, o efeito da utilização de diferentes temperaturas e pressões da água em máquinas de café expresso (robusta) na extração de cafeína, foi estudado por Caprioli e colaboradores (2014). Estes autores concluíram que uma combinação de temperatura de 92 °C e pressão a 7 ou 9 bar seria o cenário ideal para a extração deste composto, o que foi comprovado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [90].

Acredita-se que este composto fisiologicamente ativo, bloqueia os recetores de adenosina no cérebro e noutros órgãos. Este efeito conduz à redução da capacidade da atividade celular, as células nervosas estimuladas libertam a adrenalina, o que aumenta a frequência cardíaca, pressão arterial e fluxo sanguíneo nos músculos, diminuindo o fluxo sanguíneo para a pele e órgãos, fazendo com que o fígado liberte glicose. Acresce ainda que a cafeína também aumenta os níveis do neurotransmissor dopamina [91].

1.6.4 Trigonelina

A trigonelina (Figura 1.6) ou ácido 1-N-metilnicotínico, é um alcalóide que deriva da piridina, formado a partir do ácido nicotínico e da N-metiltransferase (trigonelina sintetase). Foi primeiramente isolada das sementes de *Trigonella foenum-graceum* e tem sido encontrada em muitas espécies de plantas [92].

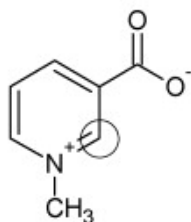


Figura 1.6 - Estrutura química da trigonelina [93].

Este composto é conhecido por contribuir indiretamente para a formação de compostos de aroma desejáveis e indesejáveis durante a torrefação do café. Juntamente com a cafeína, a trigonelina é um dos principais compostos azotados de baixo peso molecular em plantas de café [93].

A trigonelina sintase catalisa a conversão do ácido nicotínico em trigonelina (Figura 1.7).

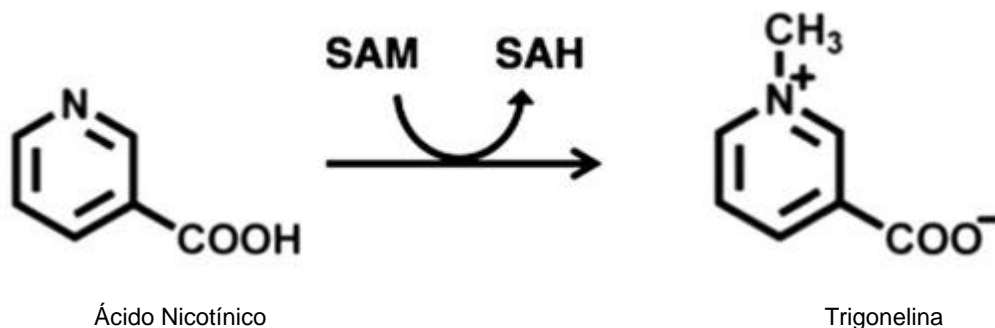


Figura 1.7 - Conversão de ácido nicotínico em trigonelina.

Sabe-se que as plantas de café contêm trigonelina em teor semelhante à cafeína, uma grande quantidade (aproximadamente 1-2% m/m) está presente no grão de café [94], apesar de a trigonelina ocorrer em todas as partes da planta do café [95].

A determinação dos níveis de trigonelina, assim como de cafeína no café, é muito importante para a indústria do café, uma vez que este composto tem um grande efeito sobre a qualidade final dos produtos de café. Ambos os compostos estão envolvidos no sabor amargo do café e a trigonelina tem sido associada à formação de aroma e à produção de aroma durante a torrefacção do café [96][97].

Entre as funções fisiológicas da trigonelina destaca-se a sua capacidade de proteger das células β do pâncreas, aumentar o índice de sensibilidade à insulina, bem como o teor da mesma, regular a atividade das enzimas antioxidantes e diminuir a peroxidação lipídica [98].

A importância nutricional da trigonelina deve-se também ao facto de esta ser precursora da niacina no processo de torrefacção. Na realidade, o café é o único produto que gera uma vitamina (niacina) durante o seu processamento [99]. Outros efeitos bioativos foram atribuídos à trigonelina, como inibição de células

cancerígenas *in vitro* e melhoria da memória por regeneração de axónios e dendrites em modelos animais [100].

1.6.4 Diterpenos

A extração de grãos de café com solventes orgânicos apolares dá origem ao óleo de café. Este óleo corresponde a uma fração lipídica composta essencialmente por triglicéridos (75%), ésteres de álcoois diterpénicos, álcoois e ácidos gordos, álcoois diterpénicos livres, esteróis, tocoferóis, desde 0,04% (tocoferóis) até 18,5% (ésteres de álcoois diterpénicos). A saponificação do óleo de café deixa uma fração insaponificável, que é maioritariamente composta por diterpenos [101].

Os diterpenos são um grupo de terpenóides, metabolitos secundários em organismos terrestres e marinhos. Normalmente ocorrem numa estrutura de 20 carbonos, onde as unidades isopreno se combinem em diferentes formas dando origem a diferentes compostos, como por exemplo, abieteno, cembrano, guanacastepeno, cafestol ou kahweol [102].

Nos últimos tempos, a atenção tem recaído nos principais diterpenos presentes no café: cafestol e kahweol (Figura 1.8).

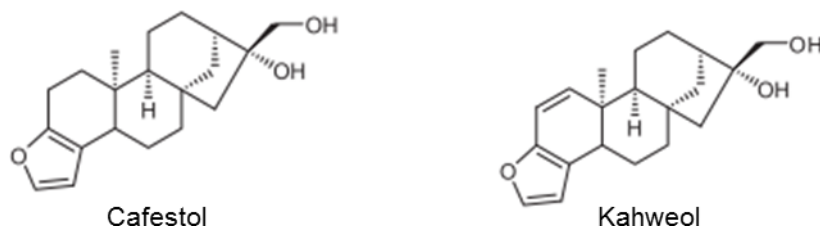


Figura 1.8 - Estrutura química dos diterpenos cafestol e kahweol (adaptado de [101]).

Estas moléculas possuem efeitos fisiológicos benéficos, como proteção contra radiação UVB, e efeitos anticarcinogénicos, anti-inflamatórios e antioxidantes [18]. Tanto o cafestol como o kahweol são relativamente específicos do café, sendo que se encontram tanto em café robusta como em café arábica (no café robusta encontra-se predominantemente cafestol), e representam cerca de 10 a 15% da fração lipídica de grãos de café torrados [103].

1.7 Extratos produzidos a partir de diferentes matrizes da indústria do café

A técnica de extração desempenha um papel crítico na recuperação de compostos bioativos a partir de resíduos vegetais. A extracção destes compostos pode ser afetada por muitos fatores, tais como a relação sólido-líquido, temperatura e tempo de extracção, entre outros [104][36].

A extração com solventes orgânicos é frequentemente utilizada para o isolamento dos compostos bioativos. O rendimento da extração e a determinação da atividade antioxidante dos extratos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos [105].

Não existe um sistema de extração com solventes que seja totalmente satisfatório para o isolamento de todos ou de uma classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos nos alimentos compreende estruturas simples e complexas, às quais correspondem uma grande variedade de compostos individuais (como ácidos fenólicos, antocianinas, taninos, etc.) presentes em diferentes quantidades e envolvidos em diferentes graus de interação com carboidratos, proteínas e outros componentes da matriz [67]. Por exemplo, a extração de catequinas é muito significativa utilizando sistemas metanol-água ou etanol-água. Por outro lado, sistemas acetona-água ou dimetilformamida-água são eficientes na extração de ácidos fenólicos [106].

No setor agroalimentar são inúmeros os subprodutos produzidos e rejeitados com teores consideráveis de compostos bioativos, como por exemplo compostos fenólicos.

A extração de compostos fenólicos, tais como os ácidos clorogénicos, a partir de café verde, café torrado, café solúvel ou subprodutos da indústria de café encontra-se extensamente descrita, sendo que a metodologia mais amplamente disseminada corresponde à extração sólido-líquido contínua (Soxhlet) ou descontínua, com utilização de solventes orgânicos, como por exemplo etanol, metanol, isopropanol ou acetona. Muito embora se trate do método de extração mais utilizado, a extração com solventes acarreta certas desvantagens, como por exemplo a perda de determinados compostos devido a ionização, hidrólise ou oxidação durante a extração [75].

De acordo com diferentes autores, solventes polares exibem a capacidade de extrair compostos fenólicos de acordo com a polaridade do solvente, isto é, quanto mais polar, mais será o teor de compostos fenólicos extraídos, em extratos produzidos a partir de café verde [107][57]. Por outro lado, solventes com menor polaridade que álcoois apresentam maior afinidade específica pelos ácidos clorogénicos, uma das classes de compostos de maior interesse no caso de subprodutos da indústria do café, e portanto, maiores concentrações de ácidos clorogénicos nos extratos são obtidas utilizando solventes de polaridades inferiores a álcoois (acetona, acetato de etilo, etc.) nas diferentes etapas da extração e purificação [108].

A acetona é um composto orgânico volátil amplamente utilizado nas indústrias química e farmacêutica como na fabricação de vernizes, corantes, couro, plásticos, explosivos, como solvente para cosméticos, antigel e agente de secagem, como soluções anti-sépticas ou de limpeza e em aplicações que requerem uma substituição económica para o etanol, sendo que a acetona é um solvente de classe 3 [109][110][111][112].

Existem diversos estudos relativamente à extração de compostos fenólicos em diferentes matrizes provenientes da indústria do café, utilizando diferentes solventes, diferentes técnicas de extração, variando tempos de contacto e temperaturas de extração, salientando a necessidade de estudos aprofundados devido à variabilidade das matrizes e à aplicabilidade das diferentes técnicas de extração.

Palomino e colaboradores (2015) avaliaram a influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos em casca de café robusta. O teor de compostos fenólicos na casca de café variou desde 96,9 até 159,5 mg EAG/g de substrato dependendo do solvente usado. De acordo com estes autores, o melhor solvente para os isolar foi a acetona e portanto, foi o solvente selecionado para as restantes extrações deste trabalho [113].

Geremu e colaboradores (2016) investigaram o efeito da variedade de café e o efeito do solvente de extração no teor de polifenólicos totais e atividade antioxidante de extratos de polpa de café. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que a polpa de café da variedade Ababuna apresentou o teor mais elevado de polifenóis (1809,9 mgEAG/gm) e de atividade antioxidante (apresentando 70% de inibição). De entre os solventes utilizados neste estudo, o metanol aquoso obteve melhores resultados para as variedades de polpa estudadas, excepto para a variedade Dessu, cujos melhores resultados foram obtidos com acetona aquosa [114].

Bravo e colaboradores (2013) estudaram a influência de diferentes parâmetros no processo de extração de compostos com atividade antioxidante a partir de borras de café. Estes autores efectuaram extração Soxhlet (1h e 3h) e extração descontínua, com diferentes solventes (água, etanol, metanol e as suas misturas), bem como extrações sucessivas, e extração com água a diferentes pH (4,5, 7,0 e 9,5). Os extratos que exibiram maior capacidade antioxidante foram obtidos com água a pH neutro, produzidos em filtro de máquina, e apresentaram um valor de fenólicos totais de 13,94 mg EAG/g e um valor de 82,40 μ mol ET/g para a atividade antioxidante [107].

As características físico-químicas de grãos de café rejeitados foram analisadas por Ramalakshmi e colaboradores (2008). Os autores realizaram extrações Soxhlet dos grãos de café com diversos solventes (hexano, clorofórmio, acetona e metanol, sucessivamente). Os extratos foram avaliados para o seu potencial antioxidante através de modelos *in vitro* como por exemplo o ensaio do DPPH. O maior rendimento de extração foi obtido na extração com metanol (12%), seguindo-se o hexano (8%), o clorofórmio (1,5%) e por fim a acetona (<1%). Em termos de atividade anti-radicalar, o extrato metanólico exibiu um valor máximo de 92,5%, seguido pelo extrato de acetona (81%) para uma concentração de sólidos totais de 100 ppm [57].

Segundo Burniol-Figols e colaboradores (2016), as condições ótimas para a extração de fenólicos a partir de grãos de café são uma relação líquido-sólido de 10 mL/ g de café e um tempo de contato de 40 minutos. Nestas condições obtiveram um extrato de ácido clorogénico de cerca de 32% após a extração de cafeína, atingindo assim uma pureza mínima para entrar no mercado como produto de elevado valor nutracêutico [34].

Também a extração assistida por microondas (EAM) tem sido considerada como uma alternativa potencial à extração convencional de solventes para o isolamento de compostos fenólicos de plantas. Em condições ótimas para a extração de ácidos clorogénicos, o solvente a utilizar seria água, atingindo concentrações entre 31-62% a partir de grãos de café verde [115].

Existem também metodologias alternativas para a obtenção de compostos de interesse a partir da matriz café, sendo que Suárez e colaboradores (2014) isolaram ácidos clorogénicos a partir de extratos aquosos de café verde por adsorção em carvão ativado. De acordo com os autores, a adsorção de ácidos clorogénicos no carvão ativado evita o uso de solventes tóxicos e é um método simples e menos demorado, podendo ser usado para substituir métodos usando solventes [116].

O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis. O período de extração pode variar entre 1 minuto e 24 horas, no entanto, longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos fenólicos sendo recomendável a adição de agentes redutores ao solvente de extração para minimizar este efeito indesejável [117].

Outro parâmetro que influencia significativamente o rendimento de extração é a temperatura, geralmente com uma correlação positiva, pois o aumento de temperatura favorece os processos difusionais e de transferência de massa. No entanto a temperaturas mais elevadas a estabilidade dos compostos polifenólicos é afetada por degradações químicas e enzimáticas e podem ocorrer perdas dos compostos mais voláteis do extrato. A decomposição térmica tem sido assinalada como a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis na medida em que envolve reações de degradação, polimerização ou reação com componentes da matriz que reduzem o rendimento de extração [118]. O efeito do gradiente de temperatura durante a extração nas características físico-químicas e sensoriais de café expresso foi investigado por Salamanca e colaboradores (2007). Os autores testaram três perfis diferentes de temperatura de extração: gradiente de temperatura ascendente (88-93 °C), gradiente de temperatura descendente (93-88 °C) e temperatura fixa (90 °C). As espécies de café investigadas foram robusta, arábica natural e waska arábica. Os resultados demonstraram que o uso de gradientes de temperatura na produção de café expresso permite aumentar ou diminuir a extração de alguns componentes do café [119].

Na tabela 1.8 encontram-se compilados alguns trabalhos onde foram aplicadas diferentes técnicas de extração e solventes, a diferentes frações de café, denotando-se o efeito destes parâmetros no rendimento de fenólicos totais obtidos.

Tabela 1.8 - Trabalhos que utilizam diferentes sistemas de extração e o efeito na quantidade de compostos fenólicos obtidos a partir de cada técnica.

Amostra	Solvente	Técnica de Extração	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Referência
Borras de café	Água Etanol	Extração líquida pressurizada	22,9	[120]
Borras de café	Etanol	Extração por ultra-sons	33,8	[121]
Borras de café	Água	Extração sólido-líquido	86,2	[104]
Borras de café	Água	Extração em autoclave com tratamentos físico-químicos	32,0	[122]
Borras de café	Etanol:água	Extração assistida por microondas	399,0	[123]
Borras de café	Etanol:água	Extração sólido-líquido descontínua	24,3	[124]
Borras de café	Etanol:água	Extração sólido-líquido descontínua	21,6	[37]
Borras de café	Metanol	Extração sólido-líquido	16,0	[125]
Casca de café	Acetona	Extração sólido-líquido	159,5	
Café verde	Água	Extração sólido-líquido	144,4	[126]
Grãos de café rejeitado	Acetona	Extração sólido-líquido	74,5	[127]

1.7.1 Biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos fenólicos

O café e os subprodutos da indústria do café contém inúmeros compostos benéficos para a saúde humana, tais como ácidos gordos, proteínas, compostos azotados não proteicos, polifenóis, minerais e carboidratos, que ao longo do tempo têm vindo a receber cada vez mais atenção por parte da comunidade científica [128].

Embora sejam reconhecidas aos compostos fenólicos uma série de propriedades interessantes do ponto de vista de saúde humana, a avaliação do potencial funcional destes compostos, isto é, a sua biodisponibilidade e destino metabólico, representam uma área de estudo em desenvolvimento. A biodisponibilidade é um tópico de extrema importância, dado que apenas os compostos que são libertados da matriz alimentar e absorvidos no intestino delgado, ficam biodisponíveis e em condição de serem utilizados pelas funções corporais e exercer os efeitos descritos acima [129].

Diversas técnicas têm vindo a ser propostas para a quantificação da biodisponibilidade. Um dos métodos mais confiáveis corresponde à medição *in vivo* da absorção em humanos. Os estudos *in vivo* em humanos são extremamente dispendiosos, exaustivos, produzindo resultados muito variáveis, pois a matriz metabólica é muito complexa e os metabolitos em estudo estão presentes em concentrações muito baixas [130][129]. Em condições *in vivo*, os compostos fenólicos da dieta têm de ser absorvidos após terem sofrido digestão gastrointestinal. A natureza dos compostos absorvidos, a sua estabilidade e a sua atividade antioxidante dependem de diversos factores, tais como a matriz alimentar, o pH, a temperatura, a presença de inibidores ou potenciadores da absorção ou a presença de enzimas, entre outros [128].

Por outro lado, os estudos *in vitro* têm vindo a ser explorados devido à sua rapidez, segurança e ao facto de não apresentarem restrições éticas como os estudos *in vivo* [129].

Os métodos *in vitro* podem ser realizados simulando os processos de digestão e absorção (para a biodisponibilidade) ou apenas o processo de digestão (para a bioacessibilidade) e a resposta do método corresponde à concentração dos compostos de interesse num “digerido final”, bem como as atividades funcionais desses digeridos [130].

Campos-Vega e colaboradores (2015) testaram a digestão gastrointestinal de borras de café (*C. arabica*) e verificaram que as amostras digeridas apresentaram quantidades inferiores de compostos fenólicos e flavonóides, mas apresentaram também maior atividade antioxidante (1 a 8 vezes superior), quando comparadas com as amostras não digeridas. Os autores sugerem que este aumento na atividade antioxidante ocorreu devido à elevada libertação de taninos condensados na fase colónica. Com este trabalho, os autores salientaram que as borras de café apresentam um elevado potencial fisiológico *in vivo* para sequestrar radicais livres presentes na circulação sistémica e em tecidos-alvo [128].

No geral, os métodos *in vitro* podem ser limitados devido à omissão do papel do cólon na digestão e absorção, no entanto existem sistemas *in vitro*, como o sistema Caco-2 (células coloretais humanas cancerígenas), que consideram o papel do cólon, mas só podem ser aplicados a amostras com concentrações relativamente baixas de compostos fenólicos, visto que também existem provas de que concentrações elevadas de fenólicos (>50µM) são tóxicas por destruírem a membrana celular causando uma transferência não específica de fenólicos, o que se traduz numa sobreavaliação da sua bioacessibilidade [131]. Relativamente ao ácido clorogénico, também foi realizado um estudo utilizando as linhas celulares Caco-2 e um sistema *in vivo* (ratos), no qual o ácido clorogénico foi testado juntamente com uma matriz alimentar real. Os autores reportam que o ácido clorogénico é pouco absorvido na sua forma nativa [132].

1.7.2 Utilização comercial e aplicações potenciais de extratos de café

Como foi sendo descrito ao longo desta introdução, o café, e consequentemente os extratos de café, apresentam propriedades anti-obesidade, anti-inflamatória, neuroprotetora, antimicrobiana, antidiabética e anticancerígena [76][78][82][133][134][83]. Estas propriedades funcionais permitem a utilização destes extratos numa vasta gama de aplicações, desde a sua utilização como suplemento

alimentar devido à sua reconhecida capacidade antioxidante ou devido à sua capacidade de inibir o crescimento de pré-adipócitos [78]; a sua utilização em produtos cosméticos dado que de um modo geral, estes compostos apresentam atividade antioxidante, antiséptica e antifúngica sobre o tecido cutâneo [135]; ou ainda a utilização como conservantes alimentares para incremento do tempo de prateleira (em alimentos mais susceptíveis à oxidação) [136].

Já existe uma variedade considerável de extratos de café à venda no mercado, maioritariamente aplicados na indústria alimentar ou nutracêutica (Figura 1.9).



Figura 1.9 - Extrato líquido de café comercial [137], extrato líquido de café verde e *Garcinia Cambogia* [138] e extrato em cápsula de café verde [139].

Na área cosmética Rodrigues e colaboradores (2015) estudaram três extratos diferentes obtidos por maceração com solventes (água, combinações água:etanol e etanol) a partir da pele prateada de café, e demonstraram por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* que os extratos não apresentavam características irritantes da pele e podiam ser considerados seguros para aplicação tópica [140].

Um estudo realizado por Amigoni e colaboradores (2017) demonstrou os efeitos benéficos do extrato de café verde sobre a resistência ao stresse, fertilidade e vida média do adulto usando *Caenorhabditis elegans* como modelo. A vida média e máxima aumentou significativamente de forma dependente da dose, e os animais pré-tratados foram mais resistentes ao stresse oxidativo. A identificação do conteúdo de compostos presentes foi determinada por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), confirmando a presença de ácidos clorogénicos em concentrações importantes, sendo 5- *o*-ácido cafeoilquinico (5-ACQ) o isómero mais abundante [141].

Martinez-Saez e colaboradores (2014), formularam e prepararam uma bebida antioxidante contendo concentrações fisiologicamente ativas de cafeína e ácido clorogénico para prevenção da acumulação de gordura corporal e possuindo propriedades sensoriais aceitáveis. A bebida final continha consistentemente alta concentração de ácidos clorogénicos [142].

Outra aplicação emergente de extratos de café, mais concretamente dos ácidos clorogénicos presentes em extratos de café, corresponde à sua formulação combinada com biopolímeros (como polissacáridos, lípidos ou proteínas), também designada por microencapsulação [80]. Esta aplicação pode ser utilizada na produção de revestimentos para preservação alimentar, de forma a aumentar o tempo de prateleira de certos alimentos. Por norma, este tipo de revestimentos formam um filme fino na superfície dos produtos, tendo atividade antioxidante e antimicrobiana, proveniente da incorporação de analitos funcionais, como o ácido clorogénico [143]. Por outro lado, esta aplicação também representa uma forma de fortificação de alimentos com ácido clorogénico encapsulado. Mais recentemente, o ácido clorogénico foi testado com sucesso para a sua utilização como agente corante em seda, apresentando uma cor entre amarelo e castanho e conferindo aos tecidos funcionalidade antioxidante, perspectivando a sua utilização na produção de roupa para uso protetor ou terapêutico [144].

1.8 Motivação e objetivos do trabalho

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a extração de compostos funcionais a partir de café em pó rejeitado, utilizando diferentes misturas de acetona:água e uma solução aquosa de hidróxido de cálcio, caracterizar as propriedades antioxidantes, anti-radicalares e antimicrobianas dos extratos e avaliar a sua composição tanto no estado bruto como após digestão gastrointestinal simulada.

Os lotes de café rejeitado por características negativas de cor e/ou aroma, representam um subproduto significativo da indústria do café e atualmente são apenas descartados e valorizados para produção de energia. De modo agregar valor a estes subprodutos, é possível formular soluções sustentáveis para o seu aproveitamento, sendo que a produção de extratos ricos em compostos fenólicos, pode representar uma nova via de valorização e de criação de uma cadeia de valor em torno destes resíduos. Para atingir este objetivo geral, o trabalho foi estruturado nas seguintes etapas:

- Preparação dos extratos de café através de maceração (extração a frio) e extração a refluxo (extração a quente);
- Determinação de rendimentos de extração avaliando a influência da acetona, combinações de acetona:água, água e hidróxido de cálcio 0,01%;
- Avaliação das propriedades antioxidantes e atividade anti-radicalar dos extratos pelo método Folin-Ciocalteu e capacidade de sequestro de radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH);
- Avaliação do efeito antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e gram-positivas;
- Identificação do perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos por HPLC –DAD;

- Avaliação do efeito da digestão gastrointestinal simulada na composição e propriedades de um extrato seleccionado.

Capítulo 2 - Metodologia

2.1 Matéria-prima

O lote de café em análise é café torrado e moído da marca Nestlé, que foi rejeitado para venda por questões de aroma e coloração. A amostra foi cedida pela empresa CMC Biomassa Lda., de Leiria, Portugal, que atualmente utiliza esta matéria-prima na produção de biocombustíveis sólidos densificados (briquetes ou *pellets*).



Figura 2.1 - Amostra de café torrado e moído utilizada neste estudo.

2.2 Caracterização da matéria-prima

2.2.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade da matéria-prima foi determinado segundo o protocolo AOAC (1999) numa estufa (Memmert 854 Schwabach W-Germany), em triplicado. A humidade foi determinada com base na perda de massa do café moído, a $105 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 3 horas. Após secagem, as amostras foram colocadas num exsiccador até temperatura ambiente e pesadas. Este parâmetro representa o teor de água e substâncias voláteis que a amostra perde durante a secagem, expresso em % (m/m) e calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2.1}$$

Onde:

m_1 é a massa de amostra juntamente com o pesa-filtro (g); m_2 é a massa de amostra seca juntamente com o pesa-filtro (g) e m_3 é a tara do pesa-filtro (g).

2.2.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada através do método gravimétrico, de acordo com a referência 935.42 da AOAC (1990). Pesou-se 1 g de amostra (em triplicado) numa balança analítica (Mettler Toledo AB204-S), em cápsulas de porcelana previamente condicionadas em mufla a 550 ± 50 °C (Nabertherm), durante uma hora e taradas. Posteriormente, colocou-se a cápsula com a amostra na mufla a 550 ± 50 °C durante duas horas, de forma a completar o processo de oxidação da matéria orgânica. Em seguida, as cápsulas contendo as cinzas foram retiradas da mufla, arrefecidas em exsiccador até temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. Os resultados foram expressos em % (m/m), a partir da fórmula:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2.2}$$

Onde:

m_1 é a massa da cápsula com cinza (g); m_2 é a tara da cápsula (g) e m_3 é a massa da amostra (g).

2.2.3 Determinação do teor de gordura

A análise do teor de gordura foi realizada utilizando o método 991.36 da AOAC (1999). A análise quantitativa do óleo baseia-se na separação dos lípidos da matriz da amostra por extração com solventes não polares. A extração de gordura foi realizada a partir de 10 g de amostra (em triplicado), utilizando 250 mL de éter de petróleo (Carlo Erba), num sistema Soxhlet aquecido numa manta de aquecimento (IBX Instruments Serie HM01), até que o líquido no extrator ficasse transparente. O extrato resultante do processo foi evaporado à secura (Rotavapor Buchi) e pesado em balança analítica (Mettler Toledo AB204-S) de forma a calcular o teor de gordura da amostra, expresso em % (m/m), de acordo com a equação 2.3:

$$\% \text{ Teor de gordura} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2.3}$$

Onde:

m_1 é a massa do balão com a gordura extraída (g); m_2 é a massa do balão vazio (g) e m_3 é a massa de amostra (g).

2.2.4 Identificação dos ácidos gordos presentes no óleo de café

O perfil de ácidos gordos do óleo de café foi determinado por transesterificação dos triglicéridos de forma a obter os correspondentes ésteres metílicos e sua análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS).

Depois do processo de extração de gordura, o óleo obtido foi dissolvido em 5 mL de éter de petróleo. Desta mistura foram retirados 2 mL para tubo de centrífuga e foram adicionados 2 mL de hidróxido de potássio metanólico 2N (Labchem; Carlo Erba). A mistura foi homogeneizada em vórtex repetidas vezes, e no final foi deixada em repouso até se completar a separação de fases. A fase orgânica (superior) foi retirada com uma pipeta *Pasteur* e foi seca com sulfato de sódio anidro (Panreac). Finalmente, a fase orgânica contendo os ésteres metílicos foi diluída para uma concentração adequada à análise subsequente e uma alíquota foi analisada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Focus GC, PolarisQ, Thermo).

As amostras (1 µL) foram injetadas a 270 °C, numa coluna DB-5 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de largura e 0,25 µm de espessura de filme. O fluxo do gás de arraste (hélio, 99,999%, Air Líquide) foi de 1 mL/min, a interface encontrava-se termostatzada a 270 °C e a fonte iônica foi mantida a 250 °C.

A aquisição foi feita no modo varrimento contínuo e a identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos foi realizada através dos tempos de retenção e por comparação com espectros das bibliotecas de referências (Nist, Wiley).

2.2.5 Determinação de proteína total

O teor de proteína total na amostra de café foi determinado com base na norma ISO 5663:1984 (método Kjeldahl). A amostra de café foi digerida com ácido sulfúrico concentrado (>95%v/v, Panreac) na presença de mistura catalisadora (sulfato de potássio + selênio negro), a 360 °C, até apresentar uma coloração transparente ou amarelo pálido. Após a digestão, a solução foi transferida para um balão de vidro de 100 mL e o volume foi aferido com água destilada. Esta solução foi filtrada para um frasco plástico e conservada a 4°C, até se concluir a análise.

Para a determinação da proteína total, a 25 mL do digerido foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína e o pH da mistura foi ajustado até 8 com hidróxido de sódio aquoso 6N (Absolve). Esta solução foi de imediato colocada a destilar (Tecator Kjeltex System 1002 Distilling Unit), sendo a fase de vapor recolhida numa solução contendo 50 mL de ácido bórico 2% e 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico (solução indicadora de vermelho de metilo + solução indicadora de azul de metilo). Após destilação, a solução de ácido bórico contendo NH_4^+ foi titulada com ácido sulfúrico 0,02 N. A determinação foi realizada em triplicado, tendo o teor de proteína sido calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Proteína total} = \frac{V_1 \times N \times b_1}{V_2 \times m_1} \times 1,4 \times 6,25 \dots \dots \dots \text{Equação 2.4}$$

Onde:

V_1 representa o volume de H_2SO_4 0,02 N gasto na titulação (mL); V_2 representa o volume de amostra digerida utilizada na destilação (mL); b_1 representa o volume final de amostra digerida

(mL); N representa a normalidade do titulante (N); m_1 representa a massa de amostra utilizada na digestão (g) e 6,25 é factor de conversão de azoto em proteína.

2.2.6 Carboidratos totais

O valor de carboidratos totais foi determinado por diferença, relativamente às outras determinações de caracterização, de acordo com a equação 2.5:

$$\% \text{Carboidratos totais} = 100 - \% \text{Humidade} - \% \text{Cinzas} - \% \text{Gordura} - \% \text{Proteína} \dots \dots \dots \text{Equação 2.5}$$

2.3 Produção de extratos a partir de café torrado e moído

De forma a avaliar metodologias com o intuito de potenciar a extração de compostos bioativos da amostra de café em estudo, foram testados dois métodos de extração: extração por refluxo e por maceração, que serão descritas nos pontos seguintes. Os solventes utilizados nas diferentes metodologias de extração ao longo deste trabalho foram água e acetona, sendo que se realizaram extrações com 12 diferentes misturas (expressas em % v/v) destes solventes: 100% acetona, 90% acetona + 10% água, 80% acetona + 20% água, 70% acetona + 30% água, 60% acetona + 40% água, 50% acetona + 50% água, 40% acetona + 60% água, 30% acetona + 70% água, 20% acetona + 80% água, 10% acetona + 90% água, 100% água e 100% Ca(OH)_2 0,01% (m/v).

2.3.1 Maceração

Pesaram-se 5 g de amostra de café moído em frascos de vidro, e adicionaram-se 50 mL de solvente. Todos os frascos foram envolvidos em papel de alumínio e guardados no escuro durante 24 horas, a temperatura ambiente e sem agitação. Após o tempo de contato, os extratos foram filtrados por papel de filtro e reservados no frio até à realização das análises de caracterização. Todas as extrações foram feitas em duplicado.

2.3.2 Extração a refluxo

O processo de extração por refluxo foi realizado num balão de fundo redondo equipado com um condensador refrigerado com água de torneira. Adicionou-se a amostra de café em pó (5 g), juntamente com reguladores de ebulição e 100 mL de solvente. A mistura foi aquecida até ao solvente entrar em ebulição, mantendo-se assim durante 15 minutos. O solvente foi recolhido por decantação e o procedimento foi repetido 5 vezes, sendo adicionados em cada repetição 100 mL de solvente fresco, e recolhendo-se 5 frações de extrato. Todas as extrações foram feitas em duplicado. e todas as frações recolhidas foram conservadas no frio até à sua caracterização.

2.4 Caracterização dos extratos de café produzidos

2.4.1 Determinação do rendimento de extração

Os rendimentos de extração foram determinados em triplicado, por gravimetria, retirando uma alíquota de extrato (de volume conhecido) e eliminando o solvente sob vácuo (Rotavapor Buchi), em balão de fundo redondo previamente tarado. Os cálculos para o rendimento foram realizados de acordo com a seguinte equação:

$$\eta = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \text{Equação 2.6}$$

Onde:

m_{extrato} representa a massa de extrato obtida depois da evaporação (g) e m_{amostra} representa a massa de amostra usada no processo de extração (g).

2.4.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais – Método de Folin-Ciocalteu

O mecanismo básico para esta metodologia de determinação de compostos fenólicos totais, consiste na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), efetuada pelos compostos fenólicos que se encontram na amostra, produzindo uma mistura de óxidos azuis de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdénio (Mo_8O_{23}) com coloração azul [145]. A monitorização da reação é efetuada por colorimetria, a um comprimento de onda de 750-765 nm, permitindo a quantificação de compostos redutores, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor de compostos fenólicos. A reação ocorre em meio alcalino, assegurado pela adição de carbonato de sódio (Na_2CO_3) [146][147][148].

Neste trabalho, para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se uma adaptação ao método de Singleton e Rossi (1965). Brevemente, colocou-se em tubos de ensaio a seguinte ordem e volume de reagentes: 500 μL de amostra (com diluições apropriadas), 2 mL de água destilada, 500 μL de reagente Folin-Ciocalteu (Panreac) sem diluição e 2 mL de uma solução de carbonato de sódio a 10 %m/V. Finalmente, as soluções foram misturadas em vórtex (Heidolph) e colocadas a incubar no escuro, à temperatura ambiente, durante 60 minutos. Após incubação, a cor azul desenvolvida nos diferentes tubos foi medida através da leitura da absorvância a 760 nm, num espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água destilada [149]. O ácido gálico (Sigma) foi utilizado como composto padrão de referência. Assim, o teor de fenólicos totais foi determinado a partir de retas de calibração obtidas da mesma forma que a descrita para as amostras em estudo mas utilizando, no lugar destas, soluções de ácido gálico com concentrações entre os 10 e 100 mg/L (Figura 2.2). Todas as determinações foram efetuadas

em triplicado, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG), por grama de extrato ou por grama de café.

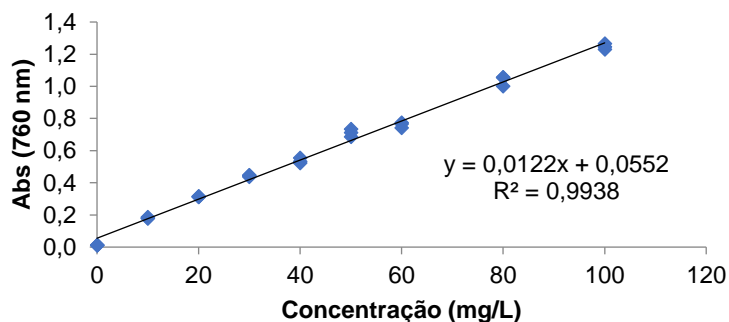


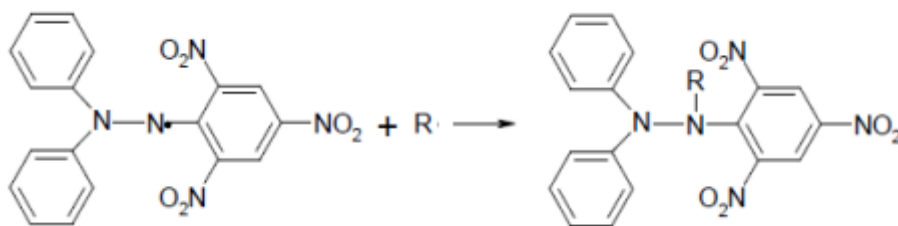
Figura 2.2 - Exemplo de recta de calibração utilizada na determinação de fenólicos totais, durante este trabalho.

2.4.3 Determinação da atividade antioxidante – DPPH

O método DPPH é um dos mais utilizados para avaliar a capacidade dos compostos como eliminadores de radicais livres ou doadores de hidrogénio e avaliar a capacidade antioxidante das amostras de alimentos. Este método baseia-se na medição do decréscimo da absorvância a 517 nm do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este radical possui uma coloração violeta, que na presença de uma substância doadora de hidrogénio, é reduzido, perdendo essa coloração [150] (Figura 2.3).

a) Radical Livre DPPH

b) Forma não radical do DPPH



a) Cor: violeta escura

b) Cor: amarelo

Figura 2.3 - Demonstração da estabilização do radical livre DPPH (adaptado [151]).

Para a execução deste método preparou-se uma solução de DPPH (Aldrich) em metanol, com uma concentração de 45 mg/L. Seguidamente, em tubos de ensaio com a seguinte ordem e volume de reagentes foram adicionados: 0,5 mL de amostra (com

diluições apropriadas em água destilada) e 4,0 mL de reagente DPPH. Finalmente as soluções foram misturadas no vórtex (Heidolph) durante 20 segundos. Após um período de incubação de 30 minutos no escuro e temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância das soluções num espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), a um comprimento de onda de 517 nm. Para a construção das rectas de calibração, realizou-se o ensaio da mesma forma, substituindo a amostra por concentrações diferentes de padrão Trolox[®], (97%, Acros Organics), variando as concentrações de padrão entre 10 mg/L e 80 mg/L (Figura 2.4). A actividade anti-radicalar das amostras relativamente ao DPPH foi realizada em triplicado e expressa em equivalentes Trolox (ET) por grama de extrato ou por grama de café.

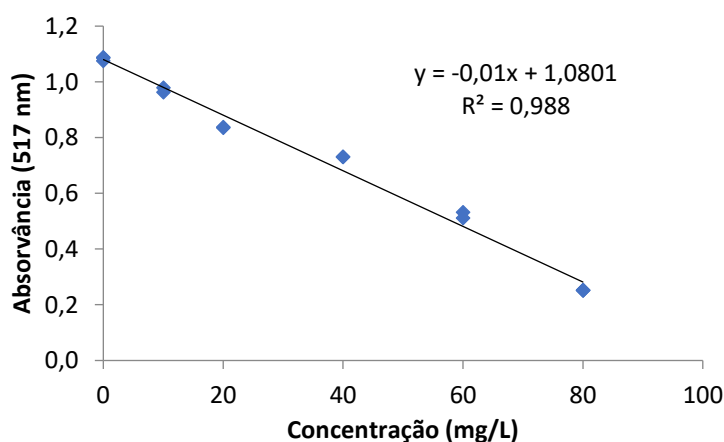


Figura 2.4 - Exemplo de recta de calibração para a determinação de atividade anti-radicalar (DPPH), utilizada neste trabalho.

A atividade antioxidante também pode ser expressa em termos de percentagem de inibição relacionada a uma dada concentração de amostra, de acordo com a equação 2.7:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{branco}}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2.7}$$

Onde:

Abs_{branco} representa a absorvância lida a 517 nm para um branco e Abs_{amostra} representa a absorvância lida a 517 nm para a amostra.

2.4.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação do teor de açúcares redutores foi realizada, em triplicado, de acordo com o método designado por método do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

O reagente DNS foi preparado dissolvendo em água destilada 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma), 16 g de hidróxido de sódio (JMS Lda) e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Scharlau), aferindo a 1 L. A solução foi posteriormente filtrada e conservada em frasco escuro.

Em tubos de ensaio foram colocados 0,5 mL de amostra (devidamente diluída) e 0,5 mL de reagente DNS. As misturas foram homogeneizadas em vórtex e incubadas durante 5 minutos em banho de água a 100 °C. Após o banho, as amostras foram deixadas a arrefecer até temperatura ambiente, altura em que se adicionaram 5 mL de água destilada. As amostras foram lidas num espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II) a 540 nm [152].

A concentração de açúcares redutores foi determinada a partir de uma recta de calibração utilizando padrões de glucose (Sigma) preparados por diluição a partir de uma solução-mãe de glucose (2 g/L) com concentrações entre 0,05 e 1,5 g/L, sujeitos ao método do DNS (Figura 2.5).

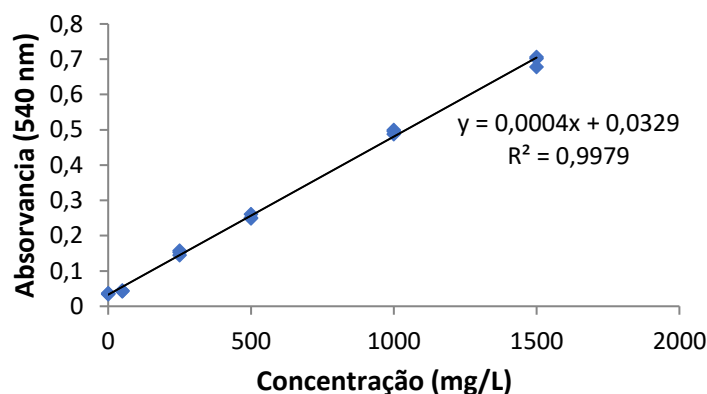


Figura 2.5 - Recta de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores pelo método DNS.

2.4.5 Atividade antimicrobiana dos extratos de café

Aos extratos produzidos a partir da metodologia de refluxo (fração 1), foram realizados testes para avaliar a sua atividade antimicrobiana. A mesma foi estudada através do teste de difusão em agár, tendo-se avaliado a capacidade antibacteriana das amostras contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) e contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC8739).

Os extratos produzidos por refluxo, correspondentes à fração 1, testados corresponderam a concentrações de 50 mg/mL (100% acetona, 90% acetona, 80% acetona, 70% acetona e 60% acetona) e 100 mg/mL (50% acetona, 40% acetona, 30% acetona, 20% acetona, 10% acetona, 100% água e hidróxido de cálcio 0,01%). Estas variações nas concentrações utilizadas estão relacionadas com a dificuldade de dissolução das amostras com maior percentagem de acetona.

Resumidamente, a técnica utilizada baseia-se na relação entre a concentração mínima de substância necessária para inibir uma estirpe bacteriana e a dimensão do halo de inibição de crescimento em redor do poço impregnado com a substância a analisar. O meio de cultura utilizado consistiu numa mistura de ágar com meio MHB (Mueller Hinton broth) e todo o material utilizado na realização desta parte experimental foi esterilizado em autoclave a 122 °C durante 15 minutos.

O meio de cultura esterilizado foi colocado em caixas de Petri e deixado solidificar a temperatura ambiente. As bactérias em estudo foram ressuspensas em 5 mL de solução de cloreto

de sódio 0,85%, homogeneizadas em vórtex até uma densidade de 0,5 (DEB-1B, GrantBio) e espalhadas nas placas contendo o meio, com uma zaragatoa esterilizada.

Em zonas das placas previamente marcadas, foram feitos furos, onde foram injectados 50 µL dos extratos a analisar, bem como etanol 96° (branco). As placas estiveram a difundir durante 30 minutos no frigorífico e posteriormente foram colocadas a incubar em estufa (Memmert) durante 24h a 37°.

Após incubação, verificou-se a formação ou não de halos e procedeu-se à sua medição.

2.5 Avaliação da influência da acetona nos extratos produzidos

De forma a validar a utilização de acetona na produção de extratos de café, para a fração 1 de todos os solventes testados (extração por refluxo), foram realizadas tomas que foram evaporadas até que permanecesse apenas a fase aquosa. A partir desta fase aquosa foram realizados os testes de Folin-Ciocalteu e de DPPH (pontos 2.4.2 e 2.4.3), de forma a avaliar a performance da acetona e também a sua potencialidade de aplicação ao nível industrial, dado o seu ponto de ebulição inferior ao da água e de se tratar de um solvente classe três, de baixa toxicidade e baixo risco para a saúde humana (aceitável sem justificação até 50 mg/dia) [112].

2.6 Análise dos compostos presentes nos extratos de café por HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de díodos)

Para a realização desta parte do trabalho experimental, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta pressão (Spectra System) equipado com uma bomba binária de gradiente (Spectra System P2000), amostrador automático (Spectra System AS1000), detetor de díodos (Spectra System UV6000LP) e controlador UV (Spectra System SN4000). A separação cromatográfica realizou-se numa coluna C18 de fase reversa (Thermo Scientific), com diâmetro de partícula de 5 µm e comprimento de 15 cm.

Antes de proceder à análise cromatográfica, alíquotas dos extratos seleccionados das extrações a refluxo (fração 1) para todos os solventes utilizados, foram evaporadas à secura (Rotavapor Buchi) e ressuspensas em etanol aquoso (50%). Seguidamente, essas alíquotas foram centrifugadas (VWR CompactStar CS4), e os sobrenadantes foram removidos e filtrados com filtro de 0,45 µm, diluídos numa proporção apropriada e transferidos *via*s de rosca de 1,5 mL, para posterior injeção cromatográfica. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

A programação do gradiente do método cromatográfico utilizado neste trabalho encontra-se descrito na tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Programa do gradiente utilizado para análise das amostras de extratos de café.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A	Eluente B
0	1,0	100	0
6	0,8	100	0
70	0,8	80	20
130	0,8	0	100
135	0,8	0	100
145	0,8	100	0
150	0,8	100	0
0	1,0	100	0

Eluente A – Ácido fórmico 1% (v/v)

Eluente B – Acetonitrilo:Ácido fórmico:Água ultra-pura 900:90:10 (% v/v)

A aquisição de cromatogramas e espectros de UV-Vis foi realizada recorrendo ao *software* Xcalibur™ 2.0.6 (Thermo Fisher Scientific Corporation), com varrimento entre 190 e 700 nm, com um intervalo de 1 nm e também aos comprimentos de onda específicos de 280 nm (catequinas e ácidos hidroxibenzóicos) e 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos). Estes comprimentos de onda foram seleccionados com base em diferentes autores, relativamente aos máximos de absorção específicos para as diferentes famílias de compostos fenólicos, sendo que os ácidos fenólicos, particularmente ácidos hidroxicinâmicos são maioritários em amostras de café [153][154].

A metodologia cromatográfica aplicada neste trabalho, teve como base outros trabalhos realizados em HPLC-DAD no Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da FCT/UNL.

As concentrações dos diferentes compostos nos extratos de café foram determinadas em termos absolutos utilizando retas de calibração construídas com padrões cromatográficos entre 10 e 100 mg/L.

As soluções-padrão foram injetadas no aparelho de HPLC, sendo registadas as áreas dos picos correspondentes e traçadas retas de concentração (mg/L) vs. área do pico cromatográfico. Os tempos de retenção, equação de reta, coeficiente de correlação e concentrações de padrão utilizadas encontram-se descritos da tabela 2.2. Os padrões analisados foram seleccionados com base nos compostos mais frequentemente encontrados em extratos de café, descritos na literatura [153][154].

Tabela 2.2 - Padrões utilizados neste trabalho, comprimento de onda máximo (nm), concentrações utilizadas (mg/L), equação da reta de calibração e coeficiente de correlação correspondentes.

Composto	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	Concentrações (mg/L)	Reta de calibração	r^2
Ácido gálico	272	10-100	$y=4.10^8x-7.10^8$	0,9944
Ácido cafeico	236-322	10-100	$y=7.10^8x-1.10^8$	0,9965
Ácido clorogénico (5-ACG)	238-326	10-100	$y=3.10^8x-2.10^8$	0,9907
Cafeína	272	10-100	$y=4.10^8x-1.10^8$	0,9998

Isômeros do ácido clorogénico (3-ACG e 4-ACG) e outros ácidos hidroxicinâmicos identificados nos extratos deste trabalho são expressos em equivalentes de ácido clorogénico (EACG). Ácidos hidroxibenzóicos são expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG). A identificação dos isômeros do ácido clorogénico (5-ACG) foi realizada com base na sua ordem de eluição e espectros de absorção descritos na literatura [154][155][156] [157].

2.7 Digestão gastrointestinal simulada de um extrato de café selecionado

2.7.1 Digestão gástrica simulada

A digestão gástrica simulada foi realizada de acordo com o descrito Briones Labarca e colaboradores (2011). Em frascos contendo 20 mL de extrato de café (100% água, fração 1, extração por refluxo), ajustou-se o pH a 2 com uma solução de HCl 1M. Em seguida adicionou-se 1 mL de uma solução de pepsina (50 mg/mL em HCL 0,1 N) por cada mL de amostra. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com agitação de 100 rpm e a 37 °C. Após o tempo de incubação, as amostras foram colocadas em gelo e de centrifugadas a 11 000 rpm, durante 30 minutos e a 4 °C (Sigma 4K15). Posteriormente, as amostras foram filtradas (Millipore Millex GP, 0,22 μ m), e reservadas no frio até realização de análises posteriores. Em simultâneo realizou-se também um ensaio controlo (branco da digestão gástrica), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultrapura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

2.7.2 Digestão gastrointestinal simulada

Para a digestão gastrointestinal simulada adoptou-se também o protocolo descrito por Briones-Labarca e colaboradores (2011). As amostras foram preparadas conforme o descrito no ponto anterior para a preparação da digestão gástrica. No entanto, após a incubação com pepsina, acertou-se o pH das amostras a 6,0 com uma solução de NaHCO_3 1 M e adicionaram-se 5 mL de uma solução de pancreatina e bÍlis (2 g/L de pancreatina e 12g/L de bÍlis em NaHCO_3 0,1 M). As amostras foram novamente incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com uma agitação de 60 rpm e à temperatura de 37 °C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 11 000 rpm, 30 minutos e a 4 °C (Sigma 4K15). Posteriormente, as amostras foram filtradas

(Millipore Millex GP, 0,22 μm), e reservadas no frio até realização de análises posteriores. Em simultâneo realizou-se também um ensaio controlo (branco da digestão gastrointestinal), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultrapura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras da digestão gástrica simulada [129].

2.7.3 Análise dos digeridos

Após o procedimento de digestão gastrointestinal simulada, os digeridos resultantes foram analisados relativamente ao seu teor de fenólicos totais (de acordo com a metodologia descrita no ponto 2.4.2), à sua atividade anti-radicalar (de acordo com a metodologia descrita no ponto 2.4.3) e foi também realizada a análise dos compostos presentes nos digeridos por HPLC-DAD (de forma análoga à descrita no ponto 2.6 deste trabalho).

2.8 Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico dos dados obtidos neste trabalho foi realizado através do *software* SPSS (IBM ® SPSS Statistics® versão 23). Realizou-se análise de variância (ANOVA) unidireccional, tendo sido realizadas também comparações múltiplas de médias através do teste de Tukey, para um nível de significância de $<0,05$.

As correlações entre variáveis foram avaliadas por determinação do coeficiente de correlação de Pearson, e classificadas de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 2.3 - Classificação das correlações de acordo com o valor obtido para o coeficiente de correlação de Pearson.

Coeficiente de correlação de Pearson (r)	Correlação
$r=1$	Perfeita positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva
$r=0$	Nula
$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$r=-1$	Perfeita negativa

Capítulo 3 - Apresentação e discussão de resultados

3.1 Caracterização da amostra de café

Na primeira fase deste trabalho realizou-se a caracterização da amostra de café utilizada. Tal como já foi referido, este lote de café foi rejeitado devido a más características de aroma e cor, não sendo portanto comercializado e sendo direccionado para a sua utilização na produção de biocombustíveis sólidos.

A caracterização do café envolveu a determinação dos seus teores de humidade, cinzas, proteína total, gordura total e carboidratos totais (perfil nutricional). Na tabela 3.1 apresentam-se os resultados obtidos (média \pm desvio padrão) para os vários componentes determinados para esta amostra de café, expressos em % mássica.

Tabela 3.1 - Perfil nutricional da amostra de café utilizada neste trabalho.

Café torrado moído	
Teor de humidade (% , bh)	7,1 \pm 0,5
Teor de cinzas (% , bs)	4,8 \pm 0,1
Proteína total (% , bs)	19,8 \pm 0,2
Carboidratos (% , bs)	64,5 \pm 0,0
Teor de gordura (% , bs)	10,9 \pm 0,3

O valor obtido para o teor de humidade encontra-se dentro do intervalo encontrado na literatura (8,5 - 13,0 g/ 100 g), para amostras de café verde em base seca. Comparando o valor de humidade do café em estudo com os valores obtidos para grãos de café torrado por Oliveira e colaboradores (2006), cuja média foi de 1,5 \pm 0,2 (% ,bs) [54], verifica-se que o valor obtido neste trabalho é bastante mais elevado, o que deve resultar do equilíbrio da amostra com a humidade ambiente pois tratando-se de um lote rejeitado que iria ser valorizado energeticamente esteve armazenado em recipientes abertos, expostos à humidade ambiental.

A determinação do teor de cinzas da amostra de café resultou num valor de 4,8 \pm 0,1 %bs. Na literatura relatam-se valores de 3,9 e 4,4 % bs para as espécies de café verde arábica e robusta, respetivamente. Valores próximos a estes também foram identificados para as mesmas espécies depois da torrefação (4,5 e 4,7 % bs, para arábica e robusta respetivamente) [158]. O teor de cinzas para o café estudado neste trabalho é semelhante aos valores apresentados na literatura, mas ligeiramente mais elevado o que pode também indiciar alguma contaminação com pós ou areias durante a armazenagem na empresa

fornecedora pois como foi referido tratava-se de uma fração de biomassa destinada à valorização energética e que portanto pode ter sido armazenada e manipulada sem os cuidados que são necessários para os produtos alimentares. Estes dados indicam também que caso se pretenda efetuar uma valorização destes lotes como fontes de extratos nutracêuticos ou cosméticos terão que continuar a ser manipulados e armazenados segundo os princípios do HACCP, mesmo após o processo de rejeição na utilização alimentar direta. O valor para o teor de cinzas obtido por Esquivel e colaboradores (2012b), para borras de café foi de 0,50 % bs, bastante inferior aos valores dos grãos pois parte da riqueza mineral do grão é transferida para a bebida durante a extração com água [9].

A proteína é um precursor de sabor importante no processo de torrefação de grãos de café [159]. O valor de proteína total determinado neste trabalho encontra-se próximo do referido por Vasconcelos e colaboradores (2007), que registaram um conteúdo de proteína total de $14,4 \pm 0,2$ % para café torrado e de $15,6 \pm 0,6$ % para grãos verdes [160]. Franca e colaboradores (2005) determinaram um teor de proteína total de $16,1 \pm 0,2$ % para grãos tostados e $17,0 \pm 0,6$ % em grãos verdes [161].

Tendo em conta que os resultados apresentados são intervalos baseados na determinação do azoto bruto e na multiplicação pelo fator 6,25 e de acordo com Macrae (1985), não existem evidências que indiquem que o teor de proteína em café de diferentes qualidades, ou inclusivamente de diferentes espécies (arábica vs. robusta) sejam significativamente diferentes [162].

Os intervalos de proteína revistos na literatura são relativamente inferiores ao determinado neste trabalho; tal pode dever-se a um maior teor de cafeína do café moído em estudo, quando comparado com os outros grão de café, pois tratando-se de uma molécula azotada, é um interferente positivo na determinação da proteína; alguns grãos de café preto, podem apresentar aproximadamente 30% mais de cafeína do que outros grão de café, o que poderia explicar os níveis mais altos de proteína, através deste efeito de matriz; estes resultados são também coerentes com a observação já feita por outros autores de que os níveis de proteína não são significativamente afetados pelo processo de torrefação [161].

Os carboidratos estão presentes no grão na forma de polissacarídeos e de açúcares de baixo peso molecular, que incluem tri, di e monossacarídeos redutores e não redutores. Entre os açúcares de baixo peso molecular, a sacarose está presente em maior concentração e os polissacarídeos constituem cerca de 50% do peso seco do café cru [163]. Como se pode verificar na tabela 3.1, os carboidratos são como expectável, os principais componentes desta amostra de café. O conteúdo médio de carboidratos totais obtido foi de 64,5 % bs (valor calculado por diferença), o que coincide com os intervalos encontrados na literatura de 58,6 a 61,8 % em grãos de café verde e de 66,0 a 67,7 % em grãos de café torrado. Outros autores também indicam que os polissacarídeos correspondem a $65,9 \pm 6,5\%$ da massa de resíduo de café, sendo que 50%, 25% e 25% dessa fração de polissacarídeos correspondem a galactomananos, arabinogalactanos e celulose, respetivamente [164][165].

O óleo de café é composto maioritariamente por triglicéridos, fosfolípidos, esteróis, tocoferóis e diterpenos característicos do café [158]. A fração lipídica do resíduo de café, após extração, caracteriza-se por ser um líquido acastanhado e viscoso com forte aroma a café, apresentando uma composição de 75% de triglicéridos, 19% de compostos diterpénicos, 5% de esteróis livres esterificados e outros compostos em quantidades vestigiais [101]. O teor de gordura determinado para o lote de café estudado foi de $10,1 \pm 0,3\%$, valor próximo do intervalo de 11 a 17%, apresentado na tabela 1.3 para café robusta e arábica torrados, respectivamente. É possível que esta amostra de café em pó armazenada em condições ambientais tenha perdido alguns dos componentes terpénicos do óleo, com maior volatilidade, o que resulta num teor de gordura ligeiramente mais baixo que os anteriormente referidos. A gama global de teor de lípidos em grão verde é de 7-17%, com uma média de cerca de 15% para arábica e 10% para robusta, evidenciando que a composição lipídica do café varia com a espécie e com os métodos de processamento do grão. Depois de realizada a transesterificação do óleo de café, a amostra foi submetida a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, de forma a identificar e determinar a abundância relativa dos ésteres metílicos de ácidos gordos presentes no óleo de café. A figura 3.1 corresponde ao cromatograma obtido com o óleo de café em análise.

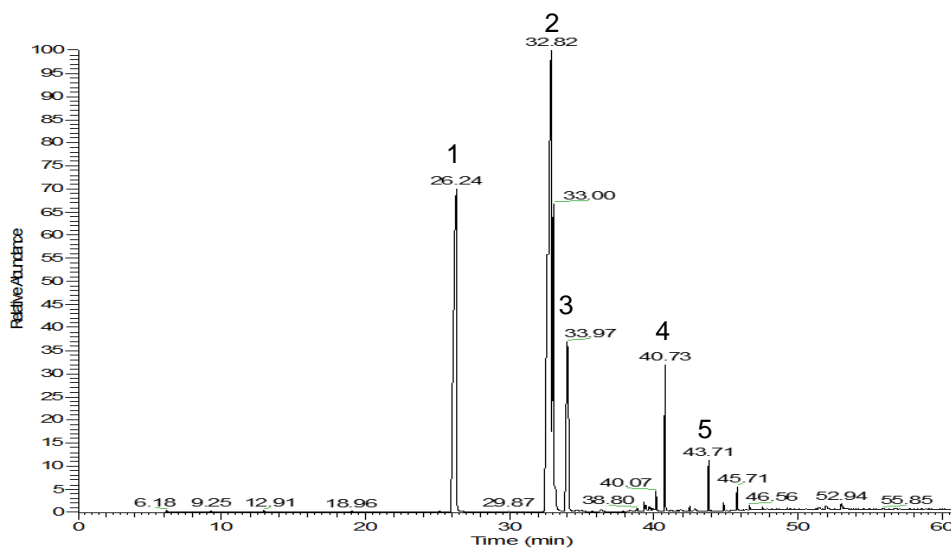


Figura 3.1 - Cromatograma do perfil de ácidos gordos do óleo de café produzido a partir da amostra de café em estudo, com tempos de retenção (min).

Na tabela 3.2 apresentam-se os picos correspondentes aos ésteres metílicos identificados no cromatograma da Figura 3.1.

Tabela 3.2 – Análise cromatográfica do óleo de café: Picos identificados, estrutura, nome e abundância relativa.

Pico Identificado	Estrutura	Nome	Tempo de retenção (min)	Abundância Relativa (%)
1	C16:0	Ácido Palmítico	26,24	25,2
2	C18:2	Ácido Linoleico	32,82	40,9
3	C18:1	Ácido Oleico	33,97	11,8
4	C18:0	Ácido Estéarico	40,73	9,2
5	C20:0	Ácido Eicosanóico	43,71	4,1
Total				91,1%

Observou-se uma predominância de ácido linoleico relativamente ao ácido oleico o que é uma característica distintiva relativamente a outros óleos vegetais provenientes de oleaginosas. O ácido linoleico é de extrema importância, pois é um ácido gordo polinsaturado essencial na nutrição humana, devido à sua participação na síntese de prostaglandinas e outros processos biológicos relacionados com a regeneração celular [166]. Atendendo à abundância relativa dos compostos presentes no perfil, verifica-se que no óleo estudado predominam os ácidos gordos insaturados.

Durante o processamento do café, por efeito da temperatura de torrefação, a gordura migra para a superfície do grão, o que pode ser considerado benéfico, porque nesta situação, a gordura poderá funcionar como película isoladora que impede a perda de aromas [167]. A composição química do óleo de grãos de café saudáveis já foi estudada e os dados estão disponíveis na literatura para frutos verdes e torrados [168][169].

Manna e colaboradores (2015) relatam que o ácido palmítico é o ácido gordo mais abundante no óleo de borras de café com um conteúdo de 46,22%, seguido pelo ácido linoleico, esteárico e oleico (19,6%; 12,3%; 23% respectivamente)[170]. No entanto, Oliveira e colaboradores (2006) afirmam que os ácidos linoleico e palmítico foram os ácidos gordos encontrados em maiores proporções em grãos de café torrado, com médias de 44% e 34%, respectivamente, e quantidades moderadas de ácido oleico (9%) e esteárico (7%) [54]. Estes resultados aproximam-se aos valores encontrados para este parâmetro neste trabalho. Também Da Costa Magalhães (2014) detetou que óleo de café apresenta uma maior percentagem de C18:2 (ácido linoleico) seguido de C16:0 (ácido palmítico) [171].

3.2 Produção e caracterização de extratos de café

De acordo com a revisão bibliográfica realizada durante a execução deste trabalho, são poucos os artigos que referem a utilização de acetona ou de soluções básicas como solventes na extração de compostos bioativos de café. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da adição de acetona à extração de fenólicos do grão com água, de forma a poder efetuar uma substituição parcial de água por um solvente mais volátil e assim reduzir custos e a exposição do extrato a temperaturas elevadas durante o processo de eliminação do solvente. A utilização de soluções de hidróxido de cálcio destinou-se a avaliar o efeito do

pH básico e também perceber se poderia ocorrer a formação de complexos entre compostos fenólicos desprotonados e o Ca^{2+} que potenciasssem a extração destes compostos. Pretendeu-se também averiguar a influência da natureza destes solventes na composição dos extratos e nas suas propriedades funcionais.

Assim sendo, nesta dissertação realizaram-se variações nas proporções de acetona (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% e 0%) em água (%v/v), utilizando também hidróxido de cálcio 0,01% para a produção de extratos a partir de café torrado e moído, utilizando duas técnicas extrativas (maceração e refluxo) e avaliando os rendimentos de extração, teor de compostos fenólicos totais, atividade anti-radicalar, teor de açúcares redutores e atividade antimicrobiana dos extratos produzidos.

3.2.1 Extração por maceração

3.2.1.1 *Rendimento de extração*

Na figura 3.2 observa-se a diferença de cor que apresentam os extratos com apenas acetona e mistura acetona:água (entre 90 e 60%) depois de 24 h de extração. A cor dos extratos intensifica à medida que ocorre um incremento na percentagem de água no solvente, permitindo constatar visualmente os efeitos da fase aquosa na extração de compostos com afinidade polar como são os compostos fenólicos, sendo que a cor mais escura também é indicativa de um aumento no rendimento de extração.



Figura 3.2 - Extratos obtidos por maceração 24 h (de acetona 100% até 60%).

Na figura 3.3 representam-se os rendimentos obtidos no processo de maceração com tempos de contato de 24 h, utilizando os diferentes solventes.

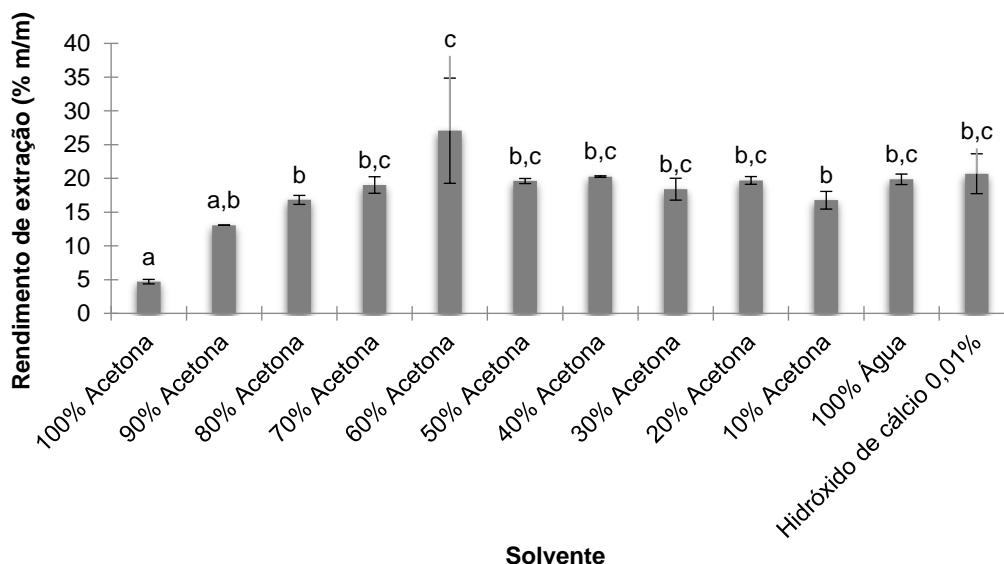


Figura 3.3 - Rendimentos de extração (% m/m) obtidos para a maceração de 24 h, para os diferentes solventes utilizados. Barras classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os rendimentos obtidos por maceração situam-se entre 4,7 e 27,1 %, sendo de destacar que o rendimento mais elevado foi obtido com acetona a 60%, no entanto o desvio-padrão correspondente a este resultado é bastante elevado, o que pode justificar a diferença relativamente a outras condições.

Para as concentrações 100 e 90% acetona existem diferenças significativas, sobretudo para 100% acetona que apresentou um rendimento de extração de 4,7% significativamente inferior a todas as restantes concentrações avaliadas. Estes resultados refletem a elevada polaridade dos metabolitos do grão de café que requerem um solvente de extração com uma constante dielétrica suficientemente elevada para promover a sua solvatação e dissolução eficientes. A partir de 70% acetona observa-se uma estabilidade dos rendimentos obtidos, indicando que os 30% de água são suficientes para assegurar a maior parte das interações polares necessárias à extração dos compostos fenólicos, nomeadamente as interações dipolo-dipolo e as ligações por pontes de hidrogénio; o rendimento ligeiramente mais baixo obtido com a acetona a 10% pode ser consequência de alguma variabilidade da matriz.

Os rendimentos de extração mais elevados foram de 19,9 % e 20,7% e obtiveram-se com 100% água e hidróxido de cálcio 0,01%, respectivamente, não havendo, no entanto, diferenças significativas relativamente aos outros solventes mistos, como se pode observar na figura 3.3. Este resultado indica que o efeito de uma eventual desprotonação dos fenólicos e complexação com Ca^{2+} não parece concorrer de forma significativa face à simples dissolução nas misturas acetona:água.

O rendimento de extração é dependente do solvente e do método de extração [172]. As misturas aquosas de etanol, metanol e acetona são comumente usadas para extrair compostos fenólicos plantas, mas têm também capacidade de dissolver compostos não fenólicos como açúcares, ácidos orgânicos,

proteínas e pigmentos que podem estar presentes nos extratos e contribuem para o rendimento total de extração [173].

Relativamente aos extratos produzidos por maceração, pode-se observar que à medida que o teor de água foi aumentando o rendimento de extração também aumentou, devido ao contributo do aumento de polaridade no meio de extração, para a dissolução dos metabolitos polares fenólicos e não fenólicos.

Por outro lado, Narita e colaboradores (2014) relataram ensaios realizados com pele prateada de café, usando água como solvente, às temperaturas de 25 °C e de 210 °C, tendo concluído que o rendimento foi 1,8 vezes superiores à temperatura mais elevada o que indica que a extração a quente poderá ser mais eficiente pois o aumento nas quantidades extraídas é suficiente para compensar qualquer degradação que possa ocorrer a estas temperaturas mais elevadas [21].

3.2.1.1 Compostos fenólicos totais e atividade anti-radicalar

O teor de fenólicos totais foi determinado com recurso ao método de Folin-Ciocalteu e os resultados obtidos encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (mg EAG/g extrato) e por grama de café (mg EAG/g café) (Tabela 3.3 e Figura 3.9). Esta reação é específica para compostos com capacidade redutora, sendo os compostos fenólicos particularmente reativos nas condições do ensaio, mas podendo existir outros componentes da matriz que também apresentam capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu [174].

Tabela 3.3 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por maceração, expressos em mg EAG/g extrato.

Solvente	Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)
100% Acetona	19,5±0,7 ^a
90% Acetona	208,3±10,4 ^c
80% Acetona	119,4±3,5 ^b
70% Acetona	194,5±1,7 ^c
60% Acetona	382,1±16,4 ^f
50% Acetona	341,8±12,4 ^e
40% Acetona	332,4±5,5 ^e
30% Acetona	337,8±4,3 ^e
20% Acetona	308,8±12,2 ^d
10% Acetona	136,1±2,2 ^b
100% Água	131,6±3,6 ^b
Hidróxido de cálcio 0,01%	143,0±2,6 ^b

Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O menor teor de compostos fenólicos foi obtido com acetona 100%, este solvente tem diferenças significativas com os demais solventes testados. Com a adição de uma pequena fração de água (acetona a 90%), o rendimento de compostos fenólicos aumentou significativamente mas só quando a percentagem de água ultrapassou os 40% (acetona a 60%), o teor de fenólicos ultrapassou o valor de 300 mg de EAG/g.

Os extratos com percentagens de acetona entre 20% e 60% apresentaram rendimentos superiores a 300 mg de EAG/g e o rendimento aumentou com a percentagem de acetona no extrato atingindo o valor mais elevado de $382,1 \pm 16,4$ mgEAG/g no extrato com 60%. Para valores inferiores a 20% de acetona a penetração do solvente na matriz pode ser limitada pelo óleo presente na superfície das partículas de café, e que funciona como uma barreira aos solventes muito polares à temperatura ambiente. Por outro lado o aumento da polaridade do solvente nos extratos obtidos com acetona 10%, água 100% e hidróxido de cálcio 0,01% pode favorecer a extração de compostos não fenólicos que contribuem para o rendimento elevado de extração, mas não para o carácter redutor.

Na figura 3.4 observam-se os resultados de fenólicos totais para os extratos produzidos por maceração em mg EAG/g café.

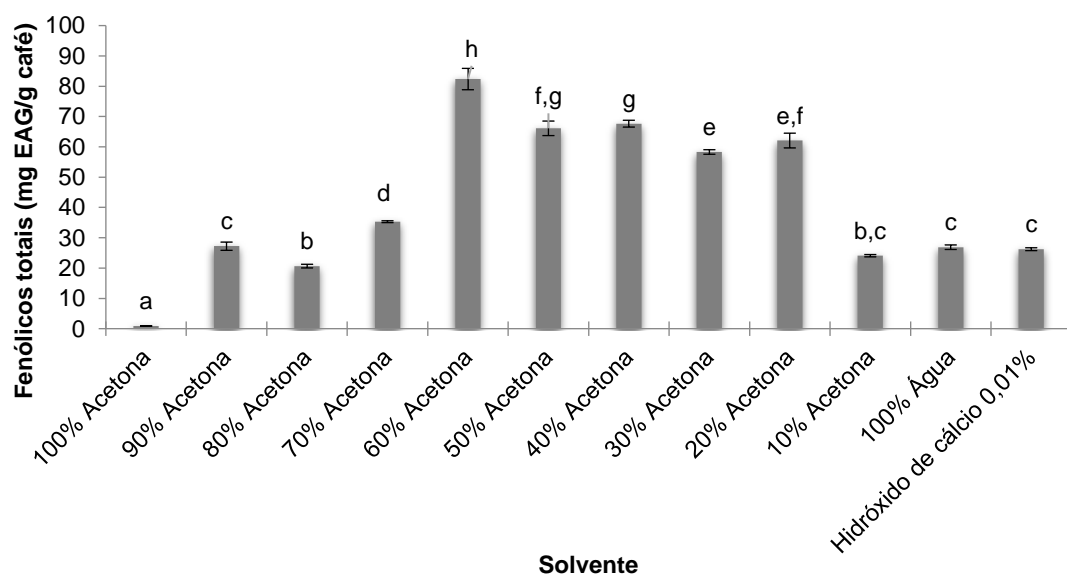


Figura 3.4 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por maceração, expresso em mg EAG/g café. Barras classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A concentração de fenólicos por grama de café apresenta uma variação análoga à concentração de fenólicos por grama de extrato o que confirma que os rendimentos mais elevados obtidos com 10% de acetona, 100% de água e a solução de 0,01% de hidróxido de cálcio devem ter o contributo de compostos polares não fenólicos, pois as concentrações de fenólicos nestes extratos são claramente inferiores às dos

extratos obtidos com 20% acetona até 60% de acetona. Os extratos produzidos com acetona 60% destacam-se com um rendimento de 82,4 mg EAG/ g café significativamente diferente dos rendimentos obtidos com os restantes solventes.

As misturas acetona:água são solventes eficazes para a extração de fenólicos de diferentes fontes naturais, especialmente de matrizes de proteínas, uma vez que esta mistura é capaz de degradar complexos de polifenol-proteína [175], sendo que a amostra de café em análise neste trabalho apresentou um teor de proteína total de $19,8 \pm 0,2$ % bs.

Moreira Penna (2015) realizou trabalho com grãos de café rejeitados e moídos, produzindo extratos com acetona 50%, verificando um valor máximo de fenólicos totais de 71,34 mg EAG/g café verde [127]. Neste trabalho, na maceração com acetona 50% obtiveram-se 66,1 mg EAG/g café, podendo dizer-se que este valor está em concordância com o autor anteriormente referido, dado que café torrado geralmente apresenta teores de compostos fenólicos mais baixos, quando comparado com café verde [158].

Extratos acetónicos, acetona-água (80:20 v/v), de casca, polpa e borra de café foram analisados para a determinação de fenólicos totais por Palomino e colaboradores (2015). Os resultados obtidos foram de 159,50; 72,88 e 77,25 mg EAG/g de resíduo respetivamente [176]. Por comparação, o rendimento de extração de fenólicos totais obtido na maceração com acetona 80% foi de 20,6 mg EAG /g café, e portanto bastante mais baixo que os valores obtidos por Palomino e colaboradores (2015). Estas diferenças no conteúdo fenólico podem dever-se a diferenças na razão solvente: matriz, temperatura de extração e regime de agitação, que foram superiores aos utilizados neste trabalho.

Os extratos produzidos pela metodologia de maceração foram também avaliados para o seu potencial antioxidante através do teste do DPPH, de forma a monitorizar a sua atividade anti-radicalar, expressa em mg de equivalente de Trolox (ET) por grama de extrato (mgET/g extrato) e também por grama de café (Tabela 3.4 e Figura 3.5).

Tabela 3.4 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg EAG/g de extrato.

Solvente	Atividade anti-radicalar (mg ET/g extrato)
100% Acetona	32,3±0,8 ^a
90% Acetona	335,7±5,5 ^f
80% Acetona	517,7±1,4 ^g
70% Acetona	134,0±8,2 ^b
60% Acetona	147,5±1,4 ^b
50% Acetona	254,0±5,9 ^{d,e}
40% Acetona	263,0±6,6 ^e
30% Acetona	254,2±40,5 ^{d,e}
20% Acetona	225,3±4,0 ^{c,d}
10% Acetona	204,8±6,2 ^c
100% Água	217,1±4,8 ^{c,d}
Hidróxido de cálcio 0,01%	246,4±3,4 ^{d,e}

Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

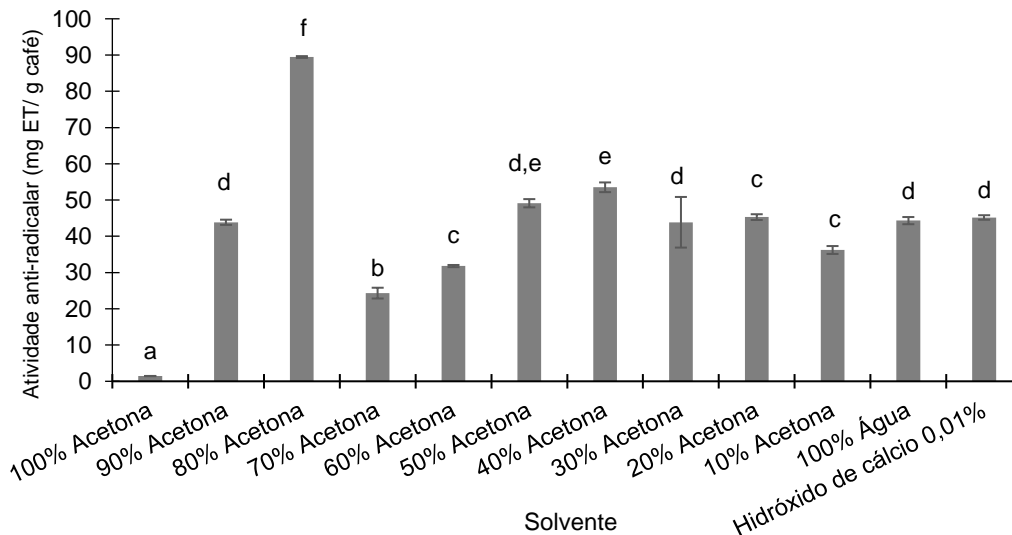


Figura 3.5 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg EAG/g de café. Barras classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O menor valor detectado neste trabalho para o parâmetro de atividade anti-radicalar foi para acetona 100% (32,3±0,8 mgET/g de extrato). Os extratos obtidos com 100% acetona e 70% acetona apresentaram valores de atividade anti-radicalar significativamente inferiores a todos os outros extratos, enquanto o

extrato obtido com 80% de acetona apresentou um valor desta atividade significativamente superior aos de todos os outros extratos. Os extratos com mais de 50% de água apresentam valores de atividade anti-radicalar semelhantes incluindo aqueles com mais de 90 % de água que anteriormente verificámos terem um teor de compostos fenólicos distinto.

Para os extratos produzidos através do processo de maceração, não se observou correlação positiva forte ou mesmo moderada entre o conteúdo de fenólicos totais e a actividade anti-radicalar, com um coeficiente de correlação de Pearson de 0,06. (Figura 3.6), o que confirma que os extratos podem conter outros compostos não fenólicos com maior ou menor contributo para a atividade anti-radicalar; por outro lado a sequestração de radicais DPPH pode apresentar diferenças decorrentes da natureza do solvente o que no caso destes extratos pode ser um fator diferenciador [177].

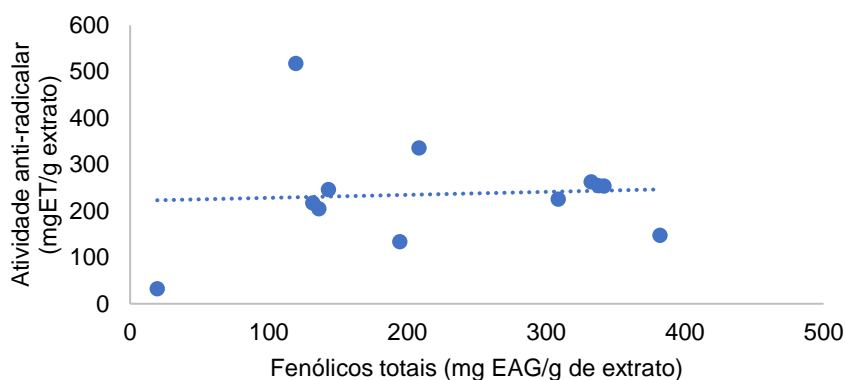


Figura 3.6 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/g de extrato) e a atividade anti-radicalar (mgET/g de extrato) para os extratos produzidos por maceração para os diferentes solventes.

No trabalho feito realizado por Sousa e colaboradores (2011), para a atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH, o extrato hidroalcoólico do resíduo de goiaba apresentou a maior atividade antioxidante, com EC_{50} de $142,89 \pm 4,85$ mg/mL, seguido pelo extrato hidroalcoólico (EC_{50} de $308,07 \pm 0,75$ mg/mL) e aquoso (EC_{50} de $386,46 \pm 1,41$ mg/mL) do resíduo de acerola, o que é similar ao concluído para a atividade anti-radicalar dos extratos com misturas de acetona:água deste trabalho, onde algumas misturas acetona:água tiveram melhores resultados que os extratos aquosos [178].

3.2.2 Extração por refluxo

3.2.2.1 Rendimento de extração

O processo de refluxo foi realizado num sistema fechado com extrações sucessivas até completar 5 frações para cada concentração de solvente. Pretendia-se assim aumentar o rendimento de extração, por

aumento da temperatura de extração, da razão solvente:matriz e da realização de extrações sucessivas. Na figura 3.7 observa-se o aspecto visual das 5 frações obtidas com 100% acetona e das 5 frações obtidas com 60% acetona.



Figura 3.7 - Extratos obtido por refluxo: A – Extração com 100% acetona (5 frações). B - Extração com 60% acetona (5 frações).

Como seria expectável a primeira fração é a mais concentrada, sendo que a cor dos extratos tende a diminuir ao longo das extrações sucessivas e, portanto, a quinta fração é a mais clara. Por outro lado, a variação na cor dos extratos entre os solventes é também indicativa de que 100% acetona apresenta pior capacidade de extração, comparativamente aos extratos produzidos com 60% acetona (significativamente mais escuros).

Na figura 3.8 encontram-se os resultados obtidos para os rendimentos de extração das 5 frações recolhidas para cada solvente testado. Na figura 3.9 observam-se as médias para as diferentes frações entre todos os solventes utilizados.

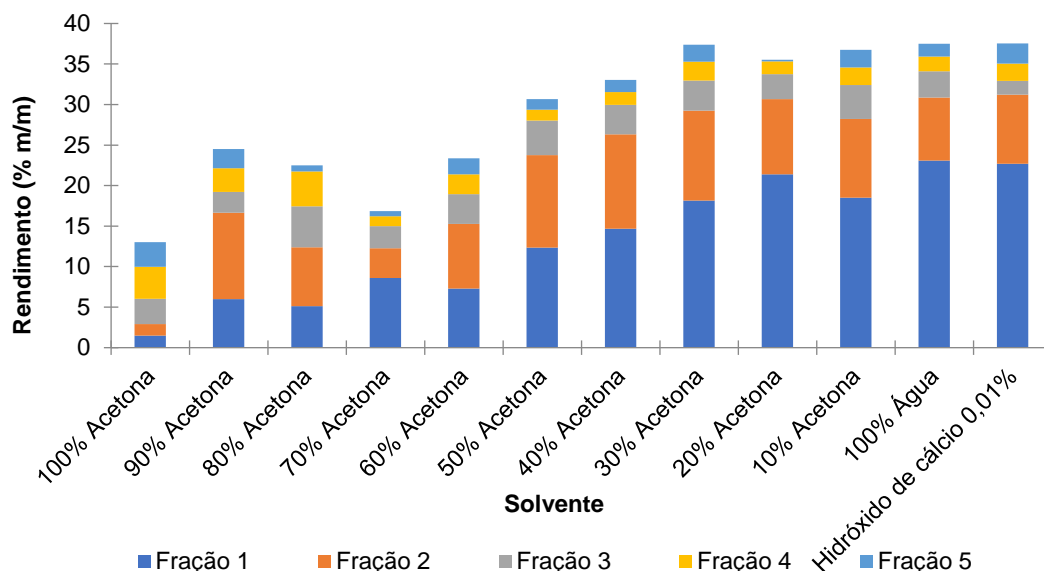


Figura 3.8 - Rendimentos de extração (% m/m) obtidos para cada uma das 5 frações recolhidas de cada solvente utilizado, na extração por refluxo.

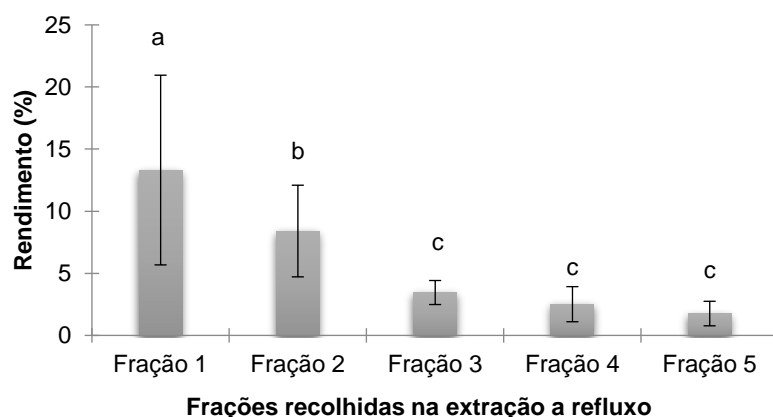


Figura 3.9 - Média dos rendimentos obtidos em cada fração (todos os solventes). Barras classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos rendimentos individuais para cada fração observa-se que, tendencialmente, a fração 1 resulta num maior rendimento de extração com os solventes analisados, isto verifica-se principalmente à medida que a percentagem de água aumenta.

Tendo em conta os resultados expostos nas figuras acima, os resultados obtidos nas extrações sequenciais indicam que a primeira extração é a mais eficaz, apresentando um rendimento médio de extração 13,31%. À medida que se continuam a extrair os compostos do resíduo com extrações

sequenciais sob as mesmas condições, o rendimento de extração vai sendo cada vez menor. Existem diferenças significativas da fração 1 para as restantes frações, e entre as frações 3, 4 e 5 conseguem-se resultados semelhantes, indicando que a continuação de extrações até à quinta extração atinge um equilíbrio na quantidade de compostos que são extraídos da matriz, até que esta se esgote. No entanto o somatório das frações 1 e 2 representam mais de 60% do extrato total recolhido para a maior parte dos solventes utilizados.

Contabilizando a totalidade de rendimento para as extrações efetuadas, verifica-se um comportamento semelhante ao observado na atividade anti-radicalar dos extratos obtidos por maceração: os extratos obtidos com mais de 50% de água apresentam rendimentos superiores aos restantes e praticamente constantes para os extratos obtidos com teores de água de 70%. O rendimento mais baixo registou-se para o extrato obtido com 100% acetona, confirmando a necessidade de alguma presença de água para que o processo de extração seja eficiente. Observam-se valores numericamente mais elevados de rendimento para os extratos obtidos com 80% de acetona e 90% de acetona, quando comparados com os restantes extratos obtidos com menos de 50% de água e um desvio padrão considerável no extrato de 90% de acetona, o que contribui para diminuir a significância das diferenças entre médias (Figura 3.10). Este comportamento sugere que no caso dos extratos obtidos com menos de 50% de água, a variação da constante dielétrica do solvente de extração deve ser mais pronunciada, afetando de forma distinta os processos de solvatação dos solutos e de penetração do solvente na matriz o que origina uma variação complexa e não regular do rendimento de extração.

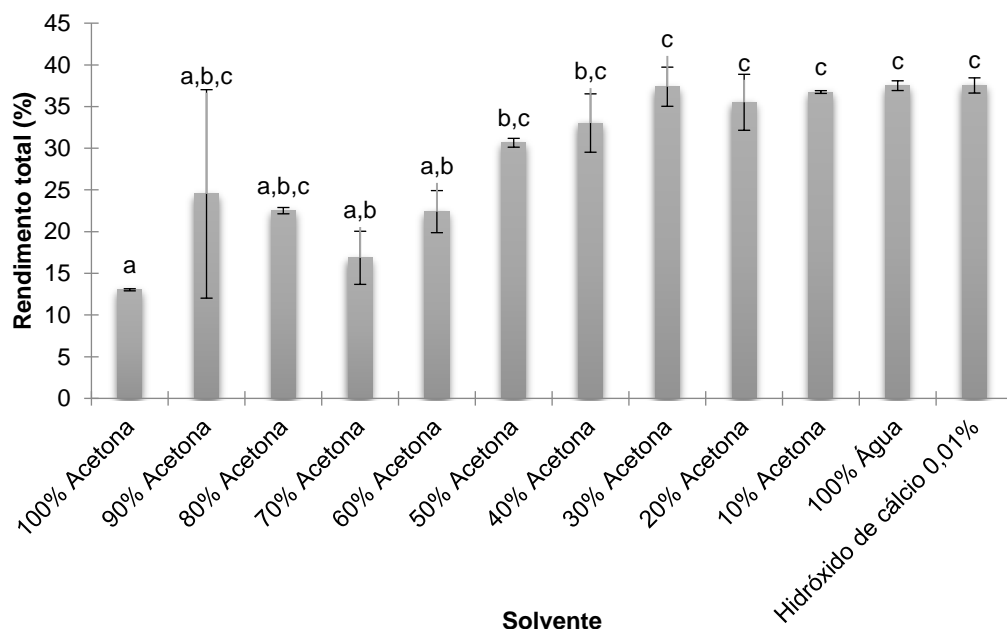


Figura 3.10 – Somatório dos rendimentos das frações recolhidas, correspondendo ao rendimento total (% m/m) para cada solvente analisado. Barras classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nebesny e colaboradores (2014) trabalharam com grãos de café robusta verde. Os mesmos foram moídos, misturados em água e fervidos num recipiente de pressão a 110 ° C durante 10 min. O processo de extração foi repetido três vezes e o rendimento de extração foi de 35,1%. Comparativamente, nesta dissertação, o rendimento para os extratos de água 100% foi de 37,50%, sendo portanto valores comparáveis e demonstrando assim uma boa eficiência no processo de extração com temperatura [179].

Mathew e colaboradores (2016) utilizaram acetona, etanol aquoso e acetona aquosa para realizar a extração em flocos de café verde. Os autores obtiveram os rendimentos de extração mais elevados com acetona aquosa (18,92%) e o valor de rendimento mais baixo utilizando apenas acetona (10,87%) [180]. Nesta dissertação, também a percentagem mais baixa de extração foi obtida com acetona 100% e a combinação de acetona aquosa aumentou o rendimento de extração. Estas combinações solvente-água resultam melhor comparando com a extração com solvente puro presumivelmente pela afinidade dos compostos que estão sendo extraídos com a fase polar.

Neste contexto, pode-se distinguir que para diferentes resíduos derivados da mesma matriz, os rendimentos de extração dependerão do nível de processamento que as mesmas apresentem, e do tipo de solvente usado de acordo com os tipos de compostos que se desejam extrair.

Para fins comparativos, na figura 3.11 observam-se os resultados obtidos para os rendimentos de extração com as metodologias de maceração e de refluxo.

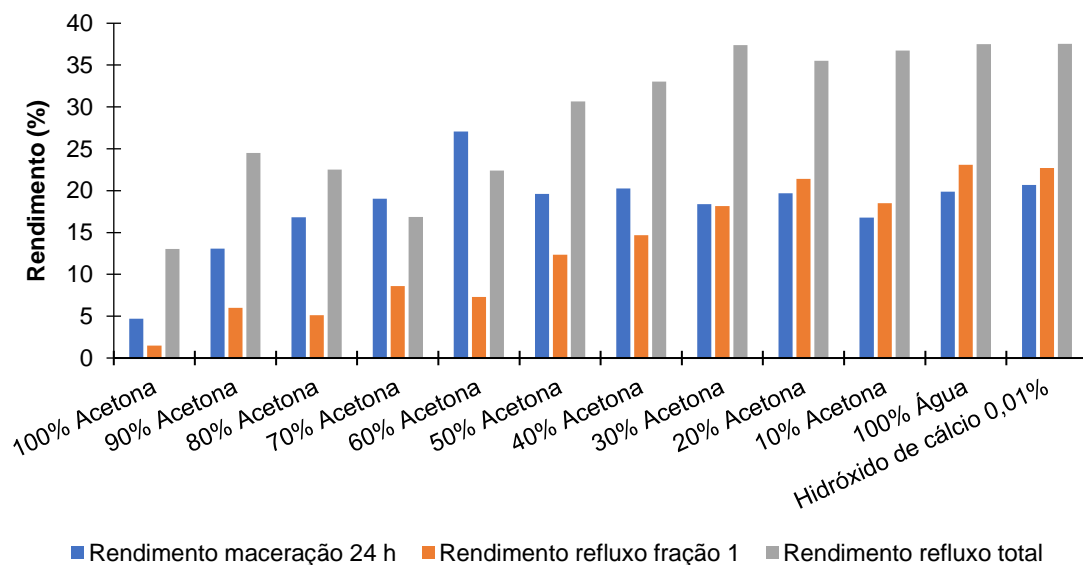


Figura 3.11 - Comparação de rendimentos (% m/m) de maceração, fração 1 de refluxo e refluxo total (somatório das 5 frações).

Apesar de se ter alcançado um bom desempenho com a extração por maceração, ao realizar as extrações com aplicação de temperatura, conseguiram-se rendimentos superiores, sobretudo nos extratos

obtidos com mais de 50% de água, que em maceração à temperatura ambiente devem apresentar algumas limitações de penetração na matriz devido à presença de alguns componentes apolares como sejam os componentes terpênicos e os triglicéridos do óleo de café. Apesar de uma razão café:solvente maior (1:20) no refluxo, comparativamente à razão utilizada na maceração (1:10), a combinação da utilização de temperatura mais elevada e das extrações sucessivas a presença da acetona em concentrações superiores a 50% permitiu ultrapassar este efeito de matriz sendo o rendimento do extrato obtido com 60% de acetona por maceração superior ao extrato obtido com o mesmo solvente por extração a refluxo.

3.2.2.2 Compostos fenólicos e atividade anti-radicalar

Nesta etapa do trabalho experimental, foi realizada uma avaliação do teor de compostos fenólicos por fração retirada (Tabela 3.5 e Figura 3.12). No trabalho feito por Bravo e colaboradores (2013) relata-se que não existem outros trabalhos com café utilizando extrações sucessivas e estudando-as individualmente [107].

Tabela 3.5 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por refluxo, para as 5 frações recolhidas, expressos em mg EAG/g extrato.

Solvente	Fenólicos totais (mg EAG/g de extrato)				
	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5
100% Acetona	26,6±0,3 ^a	36,5±7,4 ^a	15,5±0,7 ^a	9,4±0,3 ^a	20,5±1,0 ^a
90% Acetona	310,4±24,6 ^{d,e}	41,2±1,1 ^a	160,4±7,0 ^c	139,8±26,7 ^f	79,0±3,7 ^d
80% Acetona	433,8±6,4 ^f	175,4±6,1 ^c	127,7±2,6 ^b	64,3±1,0 ^c	114,7±3,6 ^f
70% Acetona	304,6±6,2 ^{d,e}	84,6±1,7 ^b	170,0±3,9 ^c	312,4±15,7 ^h	130,2±4,0 ^g
60% Acetona	615,6±12,4 ^g	293,2±11,0 ^d	143,1±2,5 ^b	37,4±1,3 ^b	27,4±0,8 ^a
50% Acetona	594,2±7,8 ^g	405,1±3,2 ^{e,f}	194,5±3,3 ^d	110,5±3,6 ^{d,e}	86,4±1,4 ^{d,e}
40% Acetona	248,4±4,4 ^b	194,0±2,4 ^c	186,1±0,2 ^d	105,2±1,5 ^d	58,9±0,8 ^c
30% Acetona	285,4±4,1 ^{c,d}	379,9±10,5 ^e	239,9±2,0 ^e	132,9±1,9 ^{e,f}	37,9±2,00,3 ^b
20% Acetona	264,8±6,7 ^{b,c}	409,7±11,8 ^f	166,2±2,2 ^c	102,8±2,3 ^d	642,0±8,6 ^h
10% Acetona	271,7±3,4 ^{b,c}	518,4±25,5 ^g	265,4±4,1 ^f	211,1±3,4 ^g	93,6±3,8 ^e
100% Água	327,3±4,3 ^e	600,0±5,9 ^h	247,1±14,8 ^e	187,2±1,8 ^g	77,9±0,9 ^d
Hidróxido de cálcio 0,01%	256,0±4,2 ^b	303,6±5,6 ^d	199,6±3,1 ^d	128,0±1,5 ^{d,e,f}	67,6±0,8 ^c

Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

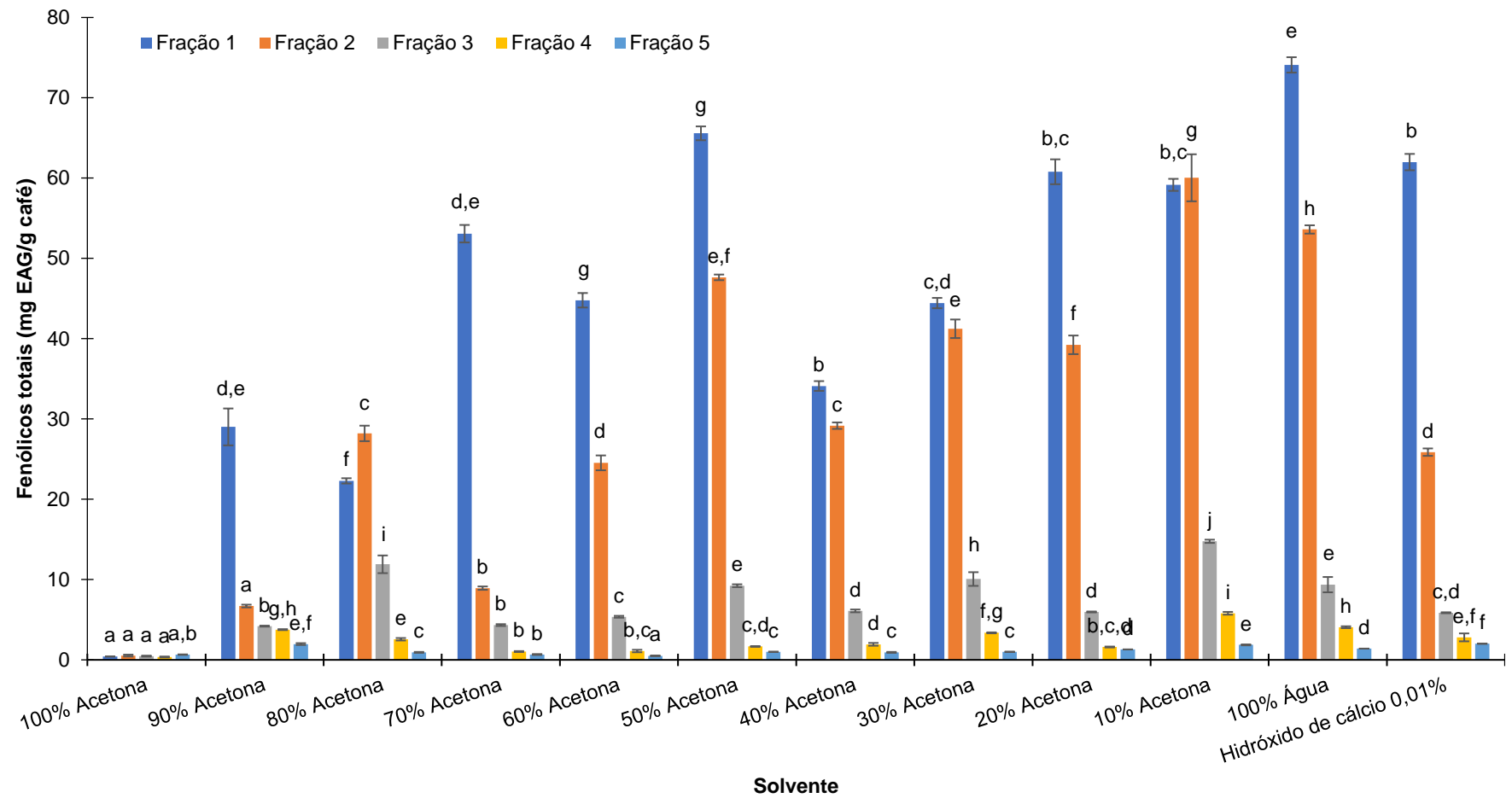


Figura 3.12 - Valores médios e respectivos desvios-padrão para o teor de fenólicos totais dos extratos obtidos por refluxo, para as 5 frações recolhidas, expresso em mg EAG/g café. Barras com a mesma cor classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na figura 3.12 (mg EAG/ g café), observa-se que o extrato de acetona a 100% apresentou a menor concentração de compostos fenólicos e registam-se duas tendências de aumento: nos extratos de 90% de acetona até 50% de acetona e de novo desde o extrato com 40% de acetona até ao extrato com 100 % de água. Este comportamento é mais evidente na primeira fração, o que é expectável pois é aquela cujas características poderão ser mais afetadas por efeitos de matriz. Esta observação confirma a hipótese de que em misturas acetona:água, a composição do solvente afeta de forma relevante a solvatação dos analitos, a sua transferência da matriz para a solução e a capacidade de penetração do solvente na matriz. Esta influência da composição dos solventes de extração no conteúdo polifenólico dos extratos já tinha sido referida por outros autores [181].

Os teores de fenólicos totais mais elevados foram obtidos na fração 1 do extrato de 60% acetona ($615,6 \pm 12,4$ mgEAG/g extrato), e do extrato de acetona a 50% ($594,2 \pm 7,8$ mg EAG/g extrato), que não tiveram diferenças significativas entre si.

Seria de esperar que os valores de fenólicos totais diminuíssem da fração 1 para a fração 2, mas tal não se verifica para os extratos de acetona a 30%, 20% 10%, água 100% e hidróxido de cálcio 0,01%, os restantes extratos comportaram-se do modo esperado. Estes valores muito elevados na segunda extração podem resultar de uma maior capacidade de penetração na matriz na segunda extração por eliminação de alguns componentes apolares da matriz que podem ter sido removidos na primeira extração, sobretudo pelo efeito da temperatura. De destacar também o extrato de acetona 20%, cujo valor mais elevado no teor de fenólicos totais se verificou na fração 5, com $642,0 \pm 8,6$ mg EAG/g extrato. De realçar que o rendimento de extração da fração 5 é muito reduzido pelo que este valor de concentração reflete sobretudo a ausência de outros componentes co-extraídos.

A extração de compostos antioxidantes (principalmente polifenóis) de resíduos industriais e da agroindústria e o grande interesse na substituição de antioxidantes alimentares sintéticos por naturais, despertou uma intensa procura na identificação de novos antioxidantes. As reações de oxidação não são de interesse exclusivo das indústrias alimentícias, na medida em que influenciam a produção de outros bens oxidáveis, como cosméticos, farmacêuticos e plásticos [182].

A composição de fenólicos totais obtidos nas diversas frações de extração por refluxo foi avaliada com o fim de valorizar a riqueza fenólica dos lotes de café torrado rejeitados apenas por motivos de cor e aroma. Motivos estes que retiram estes lotes de café da via da comercialização, tornando-os num resíduo que actualmente é utilizado diretamente para produção de energia, sem que haja uma valorização prévia, como por exemplo a extração de compostos de valor acrescentado, como é o caso dos compostos fenólicos.

Michielis e colaboradores (2012) determinaram que as misturas à base de acetona foram solventes mais eficazes do que as misturas à base de metanol na extração de fenóis a partir de diferentes frutas e vegetais. Os solventes mais utilizados para a extração de substâncias fenólicas são o metanol, a acetona e suas misturas de água, acidificadas ou não [183].

Existem alguns estudos, como o de Zakaria (2013), onde se compara a extração de fenólicos a partir de polpa de cereja de café utilizando metanol/água (60:40) e apenas água. O extrato de metanol:água continha 27,61 mgEAG/g, ao passo que o extrato de água da mesma amostra apresentou 22,75 mgEAG/g. A extração com uma mistura de solvente:água mostrou-se mais eficaz do que apenas com água quente [184], o que se verifica também neste trabalho para a fração 1 do extrato obtido com acetona a 60%.

Diferentes concentrações de metanol (entre 20% e 80%) e diferentes relações solvente/sólido (10 e 40 mL/g) foram utilizadas na extração de borras de café durante 90 minutos por Mussato e colaboradores (2011). Paralelamente, estes autores também efetuaram extrações apenas com água destilada. Contudo, o uso de metanol 60% como solvente deu melhores resultados de extração de compostos fenólicos (16 mg EAG/g borra de café). Embora o metanol seja o solvente de extração mais comumente usado devido à sua alta polaridade e altos rendimentos de extração, a característica tóxica deste solvente torna-se um problema sério quando a finalidade dos compostos extraídos é a aplicação em alimentos e indústria farmacêutica ou cosmética. Estes autores reportaram que os resultados de extração não aumentaram de forma linear quando a concentração de solvente diminuiu, mas houve um ponto ótimo após o qual o uso de concentrações menores de solvente não melhorou os resultados da extração, o que significa que a diminuição da concentração de solvente é benéfica para a extração de compostos fenólicos, mas até atingir um certo limite, após o qual a eficiência de extração se reduz [125]. Este é um comportamento análogo ao encontrado neste trabalho para as misturas acetona:água.

Outro solvente bastante documentado em matrizes da indústria do café é o etanol. Pinelo e co-autores (2007) realizaram ensaios com borras de café e avaliaram três solventes de extração: água pura, 60% de metanol e 60% de etanol e sendo que este último foi o mais eficaz (400 mgEAC/L), [185].

De acordo com Bravo e colaboradores (2013), extratos produzidos com água alcalina têm o potencial para a ocorrência de reações químicas que induzem a formação ou extração de compostos químicos que normalmente não se encontram em café [107]. Os estudos encontrados com extração utilizando água básica são maioritariamente referentes à extração de taninos, sendo que neste trabalho não se realizou nenhuma determinação específica para essa classe de compostos fenólicos [186], e os extratos obtidos com hidróxido de cálcio, apesar de rendimentos de extração e de concentração de compostos fenólicos totais interessantes, não se destacaram relativamente a outros extratos produzidos.

Por outro lado, a casca de café, que também corresponde a um resíduo da indústria do café, foi estudada por Palomino e colaboradores (2015). Os autores determinaram que o etanol não foi o melhor solvente para extração de compostos fenólicos, no entanto a acetona apresentou o melhor rendimento o extrato acetônico de casca, seguido pela borra e por último o extrato de polpa (159,50; 77,25; 72,88 mg EAG/ g resíduo respetivamente) [176]. Neste contexto na figura 3.12 observa-se que o extrato aquoso das 5 frações juntas deu como resultado 142,6 mg EAG/g café, que resultam num valor menor ao proposto pelo trabalho anteriormente citado. No entanto, o procedimento de extração foi feito de 15 em 15 minutos, ou seja, é possível que com mais tempo de interação do café com o solvente permita conseguir melhores resultados num solvente mais inócuo e facilmente aplicável a qualquer setor, como é a água.

Assim o tipo de solvente, a razão de solvente:água, o sistema de extração, espécie de café e nível de processamento, influenciam em grande parte o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos. Nem sempre a partir do mesmo resíduo de café é possível obter teores semelhantes de fenólicos totais.

Para fins comparativos, na figura 3.13 observam-se os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais obtidos em ambas as metodologias de extração utilizadas neste trabalho.

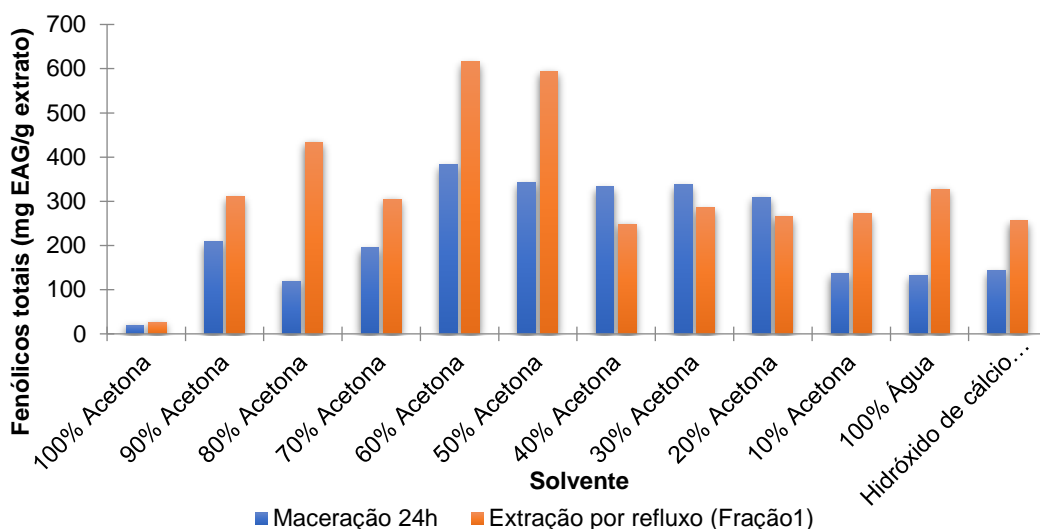


Figura 3.13 - Valores médios para o teor de fenólicos totais (mg EAG/g extrato) obtidos na maceração 24 h e na fração 1 da extração por refluxo.

As condições de obtenção destes extratos foram, em termos de razão sólido/líquido, 1:10 na maceração e 1:20 no refluxo. Para os dois sistemas de extração a acetona 100% resultou no menor teor de fenólicos totais, devendo-se possivelmente às características altamente polares dos compostos fenólicos que dificultaram a extração eficiente com apenas acetona.

A combinação solvente:água permitiu a maior extração de compostos fenólicos tanto para o processo a frio como a quente. Mas a extração por refluxo obteve um maior rendimento de compostos fenólicos.

O tempo de extração não variou a composição fenólica, considerando que na primeira fração de refluxo (15 minutos) se conseguiram resultados comparáveis ou superiores aos obtidos na maceração em 24 h.

Acima de tudo, é possível que a temperatura seja o fator decisivo na extração de antioxidantes em café rejeitado moído, dado que a extração por refluxo resulta de 15 minutos de contato direto entre a matriz e o solvente à temperatura de ebulição do solvente.

Os extratos obtidos com 60% e 50% de acetona, a refluxo (fração 1) destacam-se dos restantes quanto ao seu teor de fenólicos totais.

Seguidamente demonstram-se os valores obtidos para atividade anti-radicalar das frações sucessivas realizadas na extração por refluxo expressas em mg ET/g extrato (Tabela 3.6) e em mgET/g de café (Figura 3.14).

Tabela 3.6 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por maceração, expressa em mg ET/g de extrato.

Solvente	Atividade anti-radicalar (mg ET/g de extrato)				
	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5
100% Acetona	58,1±0,3 ^a	60,5±9,0 ^a	31,7±0,9 ^a	29,5±0,4 ^a	20,4±1,1 ^{a,b}
90% Acetona	11,8±0,1 ^a	53,0±2,6 ^a	214,8±1,6 ^{c,d,e}	208,3±1,6 ^d	93,4±3,2 ^{c,d}
80% Acetona	588,0±27,4 ^f	239,9±13,4 ^{b,c,d}	130,7±11,5 ^b	96,8±3,7 ^b	142,1±6,9 ^f
70% Acetona	383,2±25,5 ^d	105,5±1,9 ^{a,b}	184,0±3,5 ^{b,c,d}	351,8±11,9 ^e	134,8±11,0 ^{e,f}
60% Acetona	730,6±12,3 ^g	272,8±13,8 ^{d,e}	177,6±2,8 ^{b,c,d}	229,1±4,1 ^d	285,4±20,3 ^g
50% Acetona	618,5±18,1 ^f	524,6±11,1 ^f	278,2±3,4 ^e	112,1±0,3 ^b	108,4±5,5 ^{d,e}
40% Acetona	220,2±27,4 ^c	158,8±2,6 ^{a,b,c,d}	224,3±4,3 ^{c,d,e}	165,2±10,0 ^c	70,0±2,6 ^c
30% Acetona	252,5±28,3 ^c	262,6±12,1 ^{c,d,e}	247,8±21,1 ^{d,e}	61,3±2,6 ^a	39,1±0,6 ^b
20% Acetona	219,8±6,4 ^{b,c}	191,2±6,9 ^{a,b,c,d}	184,1±1,4 ^{b,c,d}	98,1±4,3 ^b	650,0±9,1 ^h
10% Acetona	554,8±38,6 ^{e,f}	356,1±67,7 ^e	157,1±3,8 ^{b,c}	116,6±6,3 ^b	114,1±2,3 ^{d,e,f}
100% Água	507,2±38,2 ^e	391,4±158,2 ^{e,f}	218,6±45,8 ^{c,d,e}	102,9±11,3 ^b	108,2±21,7 ^{d,e}
Hidróxido de cálcio 0,01%	151,7±1,3 ^b	116,2±52,6 ^{a,b,c}	134,3±70,5 ^b	120,9±34,0 ^b	5,1±2,3 ^a

Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Para a fração 1 e 2 o valor correspondente a acetona 90% apresentou o valor mais baixo (11,8 e 53,0 mg ET/ g, respetivamente), no entanto a mesma não apresentou diferenças significativas com a acetona 100%. Por outro lado, o extrato de acetona 60% apresentou o valor máximo (730,6 mg ET/g de extrato), seguido pela acetona 50% (618,5 mg ET/g de extrato). Para esta mesma fração detetaram-se diferenças significativas entre os extratos apenas de água e hidróxido de cálcio 0,01% (507,2 e 151,7 mg ET/g de extrato, respetivamente).

Para a fração 2 os valores de atividade anti-radicalar mais elevados corresponderam aos extratos de acetona 50%, 10% e 100% água, com valores de 524,6, 356,1 e 391,4 mg ET/g de extrato, respetivamente.

Os valores mais baixos para as frações 3 e 4 foram os obtidos pela acetona 100%, no entanto ocorre uma mudança na quinta fração, onde a atividade anti-radicalar mais baixa foi para o hidróxido de cálcio 0,01%. Finalmente na quinta fração, é de destacar um crescimento abrupto da acetona 20%, que já tinha

sido observado na concentração de compostos fenólicos o que indica que efetivamente este extrato apresentou quantidades bastante elevadas de compostos com atividade redutora e anti-radicalar.

Tendencialmente, a acetona a 50%, acetona a 10%, água 100% e hidróxido de cálcio apresentaram um decréscimo gradual nos níveis de equivalentes Trolox desde a primeira até à quinta fração, mas a superioridade das frações 1 e 2 relativamente às restantes, é evidente para quase todos os solventes testados o que indica que uma sequência de duas extrações é adequada para remover a maior parte dos fenólicos presentes na matriz e o acréscimo de rendimento obtido a partir da 3ª extração não deve ser suficiente para justificar o consumo adicional de solvente e energia.

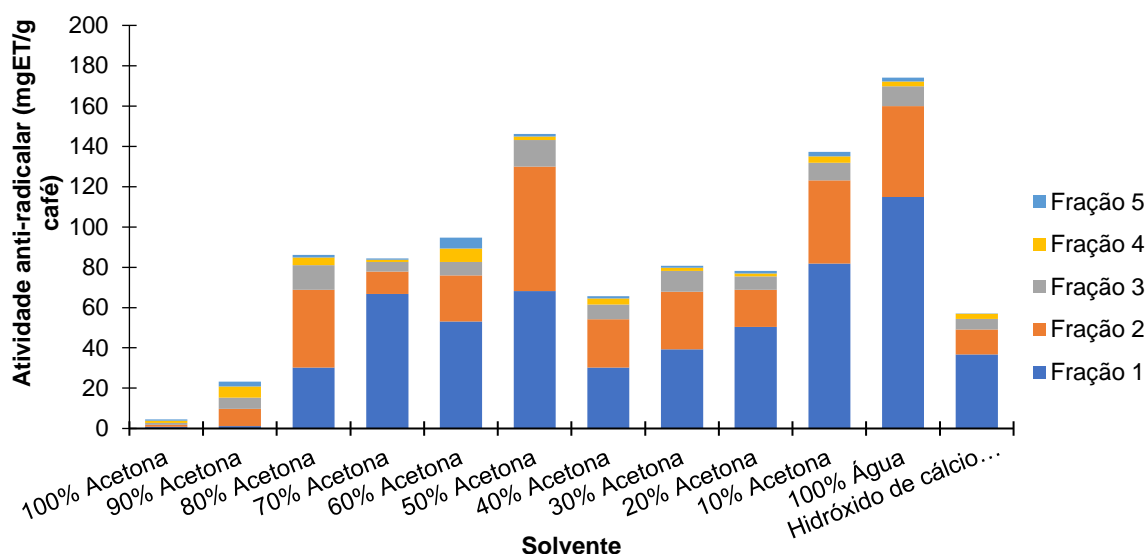


Figura 3.14 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para a atividade anti-radicalar dos extratos produzidos por refluxo, para as 5 frações sucessivas, expressos em mg EAG/g de café.

Expressando o rendimento em compostos com atividade anti-radicalar por grama de café observa-se de novo um comportamento similar na gama entre 80% de acetona a 50% de acetona e na gama de 40% de acetona até 100% de água (Figura 3.14).

De forma a representar os resultados de atividade anti-radicalar de uma forma alternativa nos extratos produzidos por refluxo, as concentrações de extratos utilizadas foram determinadas tendo em conta o fator de diluição utilizado para a realização da reação DPPH. Os valores de concentração dos extratos das frações 1 e 2 do refluxo encontram-se descritos na tabela 3.7. Cada extrato possui um comportamento distinto de acordo com a concentração testada e portanto a uniformização das concentrações foi necessária, para que estas fossem associadas a uma determinada percentagem de inibição do radical DPPH.

Tabela 3.7 – Valores médios e desvios-padrão para os valores da percentagem de inibição, obtida para uma concentração aproximada de extrato de 0,1 mg/mL, para as frações 1 e 2 da extração por refluxo, para os diferentes solventes em estudo.

Amostra	Concentração de extrato (mg/mL)	% Inibição	% Inibição
100% Acetona	0,1	6,3±0,3	6,9±0,8
90% Acetona	0,1	1,3±0,6	6,1±0,3
80% Acetona	0,1	29,1±1,1	29,2±1,3
70% Acetona	0,1	33,5±3,2	11,8±0,1
60% Acetona	0,1	52,9±0,6	20,1±0,8
50% Acetona	0,1	56,2±1,6	43,8±0,9
40% Acetona	0,1	19,5±2,3	13,7±0,2
30% Acetona	0,1	23,4±2,4	15,1±0,6
20% Acetona	0,1	29,5±0,8	10,4±0,3
10% Acetona	0,1	56,2±3,8	25,7±4,6
100% Água	0,1	47,5±2,1	30,0±1,4
Hidróxido de cálcio 0,01%	0,1	20,6±0,2	5,5±0,1

O ensaio de DPPH é extensamente utilizado de forma a testar a capacidade dos compostos de atuarem como sequestradores de radicais livres ou dadores de hidrogénio, permitindo avaliar a capacidade antioxidante de diversos produtos, entre os quais matrizes alimentares [187]. Os resultados deste teste podem ser expressos de diversas formas, no entanto para fins comparativos, são dependentes da concentração de extrato utilizado, bem como da concentração da solução de DPPH preparada para a realização do ensaio e do tempo da reação.

A maioria dos trabalhos relativos à capacidade antioxidante de café encontram-se expressos em termos de percentagem de inibição. Assim sendo, de acordo com a tabela 3.7 podemos verificar que a maior percentagem de inibição do radical DPPH na fração 1 ocorreu para os extratos produzidos com 60, 50 e 10% de acetona (52,9, 56,2 e 56,2%, respetivamente), para concentrações de extrato na ordem dos 0,1 mg/mL.

De acordo com Bravo e colaboradores (2013), extratos produzidos com borra de café, a pH alcalino, apresentaram percentagens de inibição mais elevadas quando comparados com outros solventes, nomeadamente água a pH neutro e água ácida [107]. Neste trabalho a atividade antioxidante do extrato produzido com hidróxido de cálcio 0,01%, não se destacou em termos de percentagem de inibição em ambas as frações, sendo comparável a outros extratos com diferentes combinações acetona:água e inferior ao extrato de água.

Apesar da diferença entre metodologias, Jeszka-Skowron e co-autores (2016) analisaram a atividade antioxidante de cafés de diferentes origens, tendo determinado valores de percentagem de inibição num intervalo entre 31,9 e 75,6%, sem mencionar a concentração de extrato utilizada [59]. Nesta dissertação o

valor mínimo encontrado para percentagem de inibição foi de 1,3% e o mais elevado de 56,2%, sendo mais baixo do que o relato no trabalho anteriormente referenciado.

Para a extração por refluxo verificou-se uma correlação forte positiva entre o teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g de extrato) e a atividade anti-radicalar (mgET/g de extrato), para um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,9, como se pode verificar na figura 3.15.

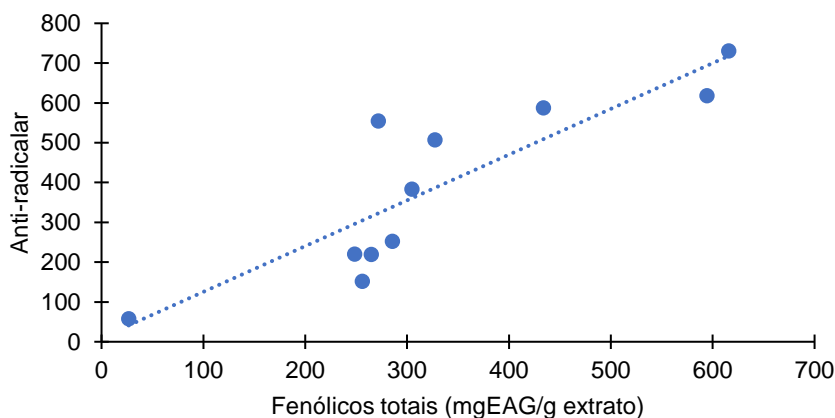


Figura 3.15 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/g de extrato) e a atividade anti-radicalar (mgET/g de extrato) para os extratos da fração 1 produzidos por refluxo para os diferentes solventes.

Utilizando esta metodologia, um maior teor de fenólicos encontra-se relacionado positivamente com um maior atividade anti-radicalar e portanto, é possível inferir que a extração por refluxo é mais eficaz na extração de compostos fenólicos com atividade anti-radicalar que a extração por maceração (ver Figura 3.6).

3.2.2.3 Açúcares redutores e compostos fenólicos

A determinação dos açúcares redutores é economicamente interessante devido à sua importância como parâmetro de classificação e qualidade do produto em alimentos [188]. No café, os açúcares redutores são os principais precursores de aromas (piranos, pirroles e pirazinas, entre outros) [189]. Estes compostos são interferentes positivos no teste de Folin, e a sua presença em extratos nutracêuticos não é muito desejável tendo em conta os efeitos metabólicos do consumo de açúcares simples.

Na figura 3.16 observam-se os resultados obtidos para os açúcares redutores e os compostos fenólicos totais correspondentes ao somatório das duas primeiras frações da extração por refluxo. Os valores são apresentados em mgGLU/L e mgEAG/L (açúcares e compostos fenólicos, respetivamente).

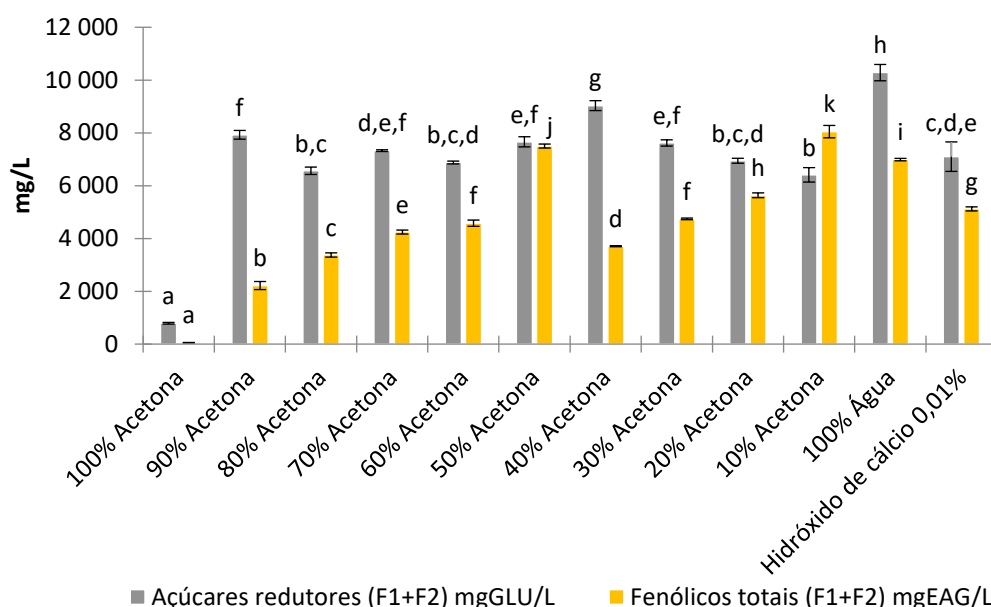


Figura 3.16 - Comparação entre os somatórios médios das frações 1 e 2 dos extratos obtidos por refluxo, relativamente ao teor em açúcares redutores e compostos fenólicos totais, em mg/L. Barras com a mesma cor, classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A partir da acetona 100% até acetona 50% observa-se um aumento constante dos compostos fenólicos, no entanto da transição da acetona 50% para acetona 40% visualiza-se uma diminuição no teor de fenólicos, que tornam de novo a aumentar até aos 10% de acetona, mantendo-se elevados nos extratos de 100% de água e 0,01% de hidróxido de cálcio. Este comportamento já comentado anteriormente reflete os diversos fatores que afetam a extração dos compostos fenólicos, de polaridade média a alta. Já os açúcares redutores sendo altamente solúveis em água são eficientemente extraídos em todos os extratos com mais de 10% de água, apresentando concentrações relativamente constantes nesses extratos. A acetona a 100% mas a presença de água é o fator decisivo na dissolução destes compostos polares.

Este fator pode também contribuir para a maior extração de compostos fenólicos ligados a glicosídeos, por soluções com maior percentagem de água, dado que os compostos fenólicos podem ocorrer na sua forma livre ou ligados a açúcares [65]. Zeng e co-autores (2017) indicaram que os ácidos fenólicos podem ser libertados a partir de derivados glucósidos (fenólicos conjugados) e identificaram os açúcares como sendo compostos protetores dos fenólicos durante a extrusão enzimática de arroz [190].

Na figura 3.17 é possível avaliar a correlação existente entre o teor de compostos fenólicos totais e o teor de açúcares redutores nas somas das frações 1 e 2 da extração por refluxo, para todos os solventes em estudo.

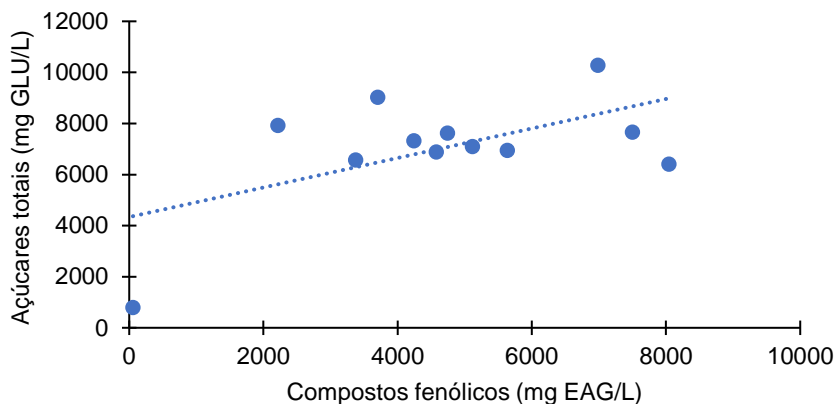


Figura 3.17 - Correlação entre o teor de fenólicos totais (mgEAG/L) e a concentração de açúcares redutores (mgGLU/g de extrato) para o somatório das frações 1 e 2 obtidas por refluxo.

Os açúcares redutores apresentaram uma correlação moderadamente positiva com o conteúdo fenólico total ($r = 0,6$). Num estudo de Constatinou e Koutsidis (2016), é relatado que nos sistemas de reação de Maillard (que acontece na torrefação do café), os antioxidantes fenólicos podem reagir com fragmentos de açúcar, formando complexos através de reações de substituição aromática eletrofílica [191].

Com tudo isto, pode verificar-se que os açúcares redutores são importantes na atividade antioxidante dos extratos do café utilizados neste trabalho.

3.2.2.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos relativamente às bactérias *S.aureus* e *E.coli*, foi determinada através do método de difusão em placa, na concentração de 50 mg/mL, para a fração 1 dos extratos com 60% de acetona até 100% de acetona e na concentração de 100 mg/mL, para a fração 1 dos extratos com mais de 50% de água. A sensibilidade normal das bactérias utilizadas foi confirmada através da realização de ensaios com brancos. Nenhum extrato apresentou inibição para ambas as bactérias em análise, em nenhuma das concentrações aplicadas.

Como se pode observar na figura 3.18 relativa aos ensaios com a bactéria *S.aureus*, é possível observar a não formação de halos, embora na imagem seja difícil de diferenciar devido à cor e a difusão dos extratos.

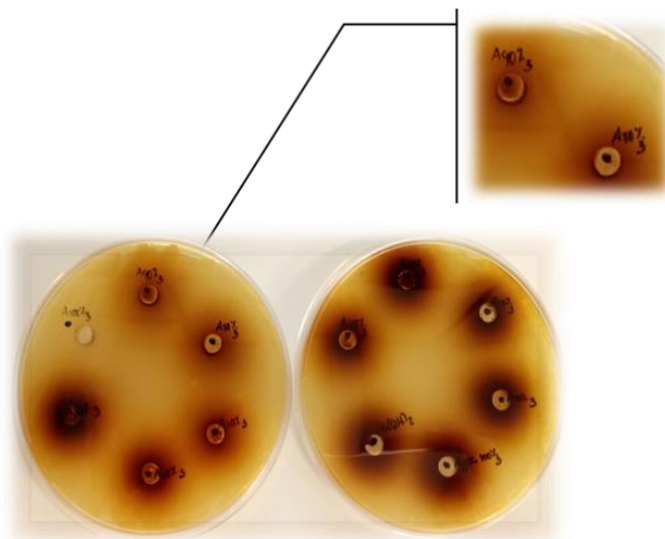


Figura 3.18 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de café em estudo, com a bactéria *S. aureus*.

A segurança alimentar é considerada essencial no desenvolvimento e produção de alimentos, incluindo compostos funcionais. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), relatou altas taxas de surtos infecciosos por população (1,2 por 100.000) na União Europeia (EU) em 2013, causados por *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Shigella* e *Staphylococcus aureus*, entre outros [192].

O modo de ação dos agentes antimicrobianos depende não só da sua composição, mas também do tipo de microrganismo, sendo principalmente relacionado com a estrutura da sua parede celular e da sua membrana externa. De um modo geral, as bactérias Gram-negativas, como a *E. Coli*, são menos sensíveis a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus*, uma vez que as primeiras possuem uma membrana externa lipopolissacarídica, que constitui uma barreira contra a penetração de inúmeras moléculas antimicrobianas. Contudo, tal não significa que as bactérias Gram-positivas sejam sempre mais suscetíveis [193][194].

Existem resultados que destacam o potencial dos extratos de café como um composto antibacteriano naturalmente ativo e não tóxico adequado para aplicações biomédicas [195], pelo que, dada a não deteção de atividade antimicrobiana nos extratos de café em estudo, se decidiu testar a atividade antimicrobiana de alguns compostos individuais dos extratos de café, referidos na literatura [154] e outros com conhecidos efeitos antimicrobianos, como a quercetina, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, rutina, ácido *trans*-ferúlico e o ácido 3,4-dimetil hidroxicinâmico. Os testes foram realizados em concentrações de 100 mg/mL, e tal como se observa na figura 3.19, não se detetou qualquer atividade antimicrobiana por parte destes compostos individuais.

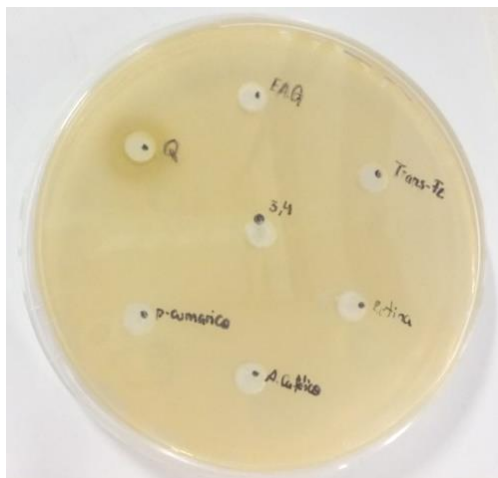


Figura 3.19 - Resultados obtidos de compostos puros com capacidade antimicrobiana (100mg/mL).

Os extratos apresentam maior atividade biológica que os compostos purificados, em razão da positiva interação sinérgica entre os diferentes compostos presentes [196], mas neste caso nem extratos nem compostos individuais demonstraram capacidade de inibir estas duas bactérias, nos níveis de concentração utilizados.

Para avaliar um agente antimicrobiano é importante determinar a concentração mínima inibitória (CMI). A CMI é considerada como a mais baixa concentração da amostra de café que inibiu o crescimento do microrganismo. Assim, um estudo de Momente e colaboradores (2015) determinou que são necessários 5 mg/mL de borra de café arábica para que a mesma apresente ação inibitória contra *S.aureus*, no entanto para ter ação contra uma ampla quantidade de microrganismos é necessária uma concentração de 80 mg/mL; a bactéria *E.Coli* requer concentrações maiores para que se detete o efeito inibitório [197]. Estes valores não coincidem com as determinações neste trabalho, dado que se utilizaram concentrações de 50 e 100 mg/mL de extrato e não se registou um efeito inibitório. Segundo Jiménez-Zamora e co-autores (2015), extratos da pele prateada e borra de café mostraram efeito antimicrobiano insignificante contra *S. aureus* e *E.Coli*, no entanto após misturar a borra de café com melanoidinas do café, os autores verificaram uma atividade antimicrobiana estatisticamente significativa ($p < 0,05$) contra ambos os microrganismos [17].

O pH também pode ter um efeito significativo na capacidade antimicrobiana de extratos de café. Amélia e colaboradores (2007) demonstraram a influência do pH (4,5 a 7,5) na atividade antimicrobiana da cafeína contra *Salmonella enterica sorovar Typhimurium* (Gram-negativo). O pH de 4,5 seguido de 5,5 promoveu um maior efeito inibitório. Ao pH de 7,5, a percentagem de inibição encontrada para a cafeína foi menor [198]. Neste estudo, o extrato produzido com água 100% apresentou um pH de 6,9 sendo possível que tal tenha tido influência nos resultados obtidos.

Outros trabalhos mencionam que para os ácidos *p*-coumárico, ferúlico e cafeico a inibição aumentava, à medida que o pH diminuía, e que para o ácido clorogénico, a inibição de *Listeria* foi maior em pH ajustado para 6,5 [199][200][201].

Observando-se os resultados para o teor de fenólicos totais e os obtidos no ensaio antimicrobiano, não se verifica uma relação positiva entre os mesmos, isto é, mesmo tendo concentrações muito significativas para o teor de compostos fenólicos totais, tal não se refletiu em termos de inibição de crescimento dos microrganismos testados.

3.3 Efeito da evaporação da acetona no teor de fenólicos e atividade anti-radicalar

Depois de evaporar a acetona presente nos extratos, analisou-se o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante da fase aquosa para as frações 1 e 2 da extração por refluxo. Os resultados para fenólicos totais (mg EAG/L) da fração 1 e 2 visualizam-se na figura 3.20.

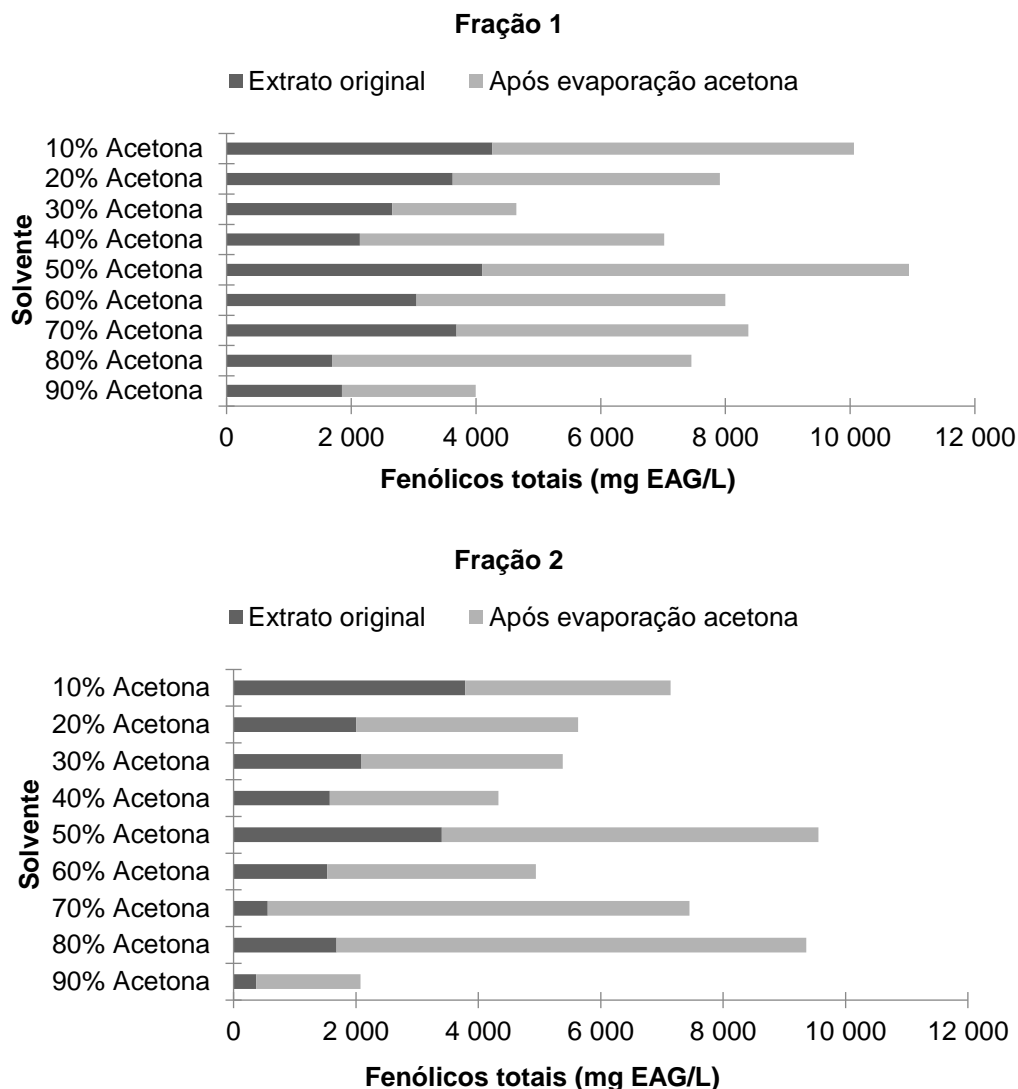


Figura 3.20 - Valores médios de fenólicos totais (mg EAG/L) da fração 1e 2 dos extratos de refluxo originais e dos extratos depois de evaporar o solvente.

Como seria de esperar, ocorreu um aumento do teor de fenólicos totais na maioria das combinações acetona:água, por concentração. A acetona 10% que apresentou no extrato original 4261 mg EAG/L depois de retirar o solvente e concentrar tudo na fase aquosa aumentou o seu conteúdo em fenólicos para 5797 mg EAG/L. Outro aumento importante destacou-se na acetona 50% que ao princípio tinha 4100 mg EAG/L conseguindo-se obter após evaporação um valor de 6841 mg EAG/L. Como exceção dos antes mencionados a acetona 30% sofreu uma diminuição de 2653 a 1994 mg EAG/L.

O aumento dos compostos fenólicos totais tiveram o mesmo comportamento para a fração 2 depois de efetuado o procedimento de extração da acetona.

Para a acetona 80%, o extrato original na segunda fração apresentou um teor de fenólicos de 1683 mg EAG/L e após a evaporação este valor aumentou para cerca de 4 vezes mais, passando a 7675 mg EAG/L.

Um fenómeno semelhante verificou-se no extrato de acetona 70%, a mesma na fração 1 no extrato original apresentou 3686 mg EAG/L e na fração 2 diminuiu para 558 mg EAG/L, depois de avaliar a capacidade antioxidante da fase aquosa determinou-se que a mesma sofreu um aumento no teor de fenólicos até 10 vezes superior (6891 mg EAG/L).

A capacidade de eliminação de radicais livres também foi analisada para estes extrato, através do ensaio de DPPH. Na figura 3.21 observam-se os resultados obtidos em mg ET/L para a fração 1 analisada antes e depois da evaporação da acetona dos extratos.

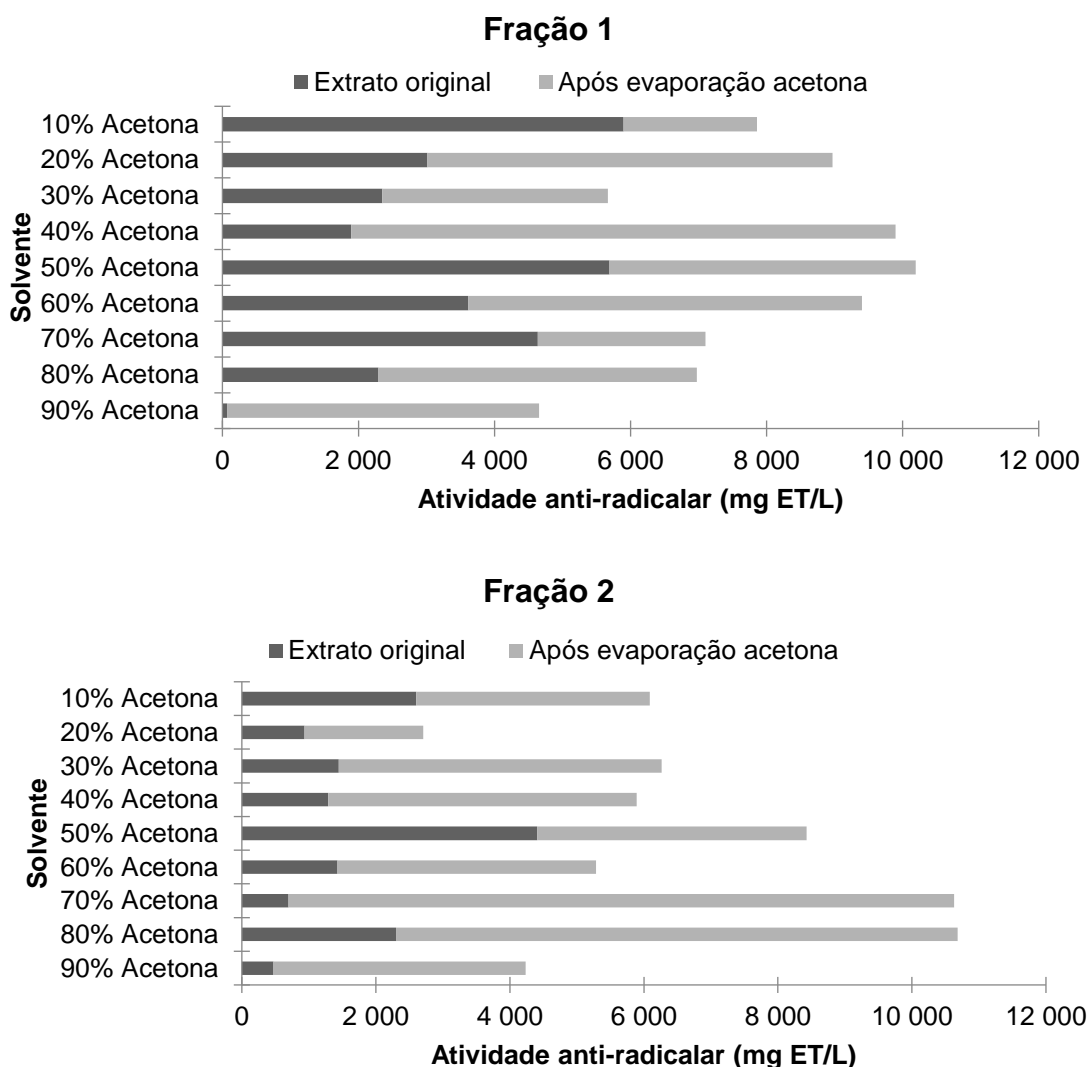


Figura 3.21 - Valores médios para a atividade anti-radicalar (mg ET/L) da fração 1 e 2 dos extratos de refluxo originais e dos extratos depois de evaporar o solvente.

Na fração 1, o extrato de acetona 90% apresentou apenas 70 mg ET/L, sendo que depois de evaporada a acetona este valor aumentou para 4585 ET/L, já na fração 2 ocorreu um incremento de 474 para 3762

mg ET/L. Contudo, no momento de obter o extrato por evaporação seria rentável retirar apenas 10% de água em lugar de ter um gasto superior ao retirar elevadas quantidades de água considerando o ponto de ebulição deste solvente.

Com a acetona 80% na fração 2 destaca-se o aumento para quase o triplo do obtido no extrato original (de 2303 para 8377 mg ET/L). No extrato de acetona 70% aconteceu que na fração 1 o nível de equivalentes trolox decresceu mas na fração 2 de ter 696 ET/L encontrou-se 9933 ET/L. Outro solvente com razão superior de água como a acetona 10% desceu o teor na fração 1 depois de retirar a acetona mas na fração 2 comportou-se semelhante aos outros aumentando de 2600 a 3488 ET/L.

Comparativamente com os extratos de água que tiveram na fração 1 do refluxo uma média de 4287 mg EAG/L, verifica-se que depois de retirar a acetona e concentrar tudo na fase aquosa, consegue-se um maior rendimento de fenólicos totais, o que coincide com o declarado por Papagiannopoulos e colaboradores (2004). Estes autores descobriram que a extração de acetona e água produz um maior rendimento de compostos fenólicos que a extração apenas com água [202], e portanto o efeito de concentração será muito mais significativo utilizando esta mistura de solventes.

Embora os resultados estudados para a atividade antioxidante sejam significativos, a escolha do solvente é um fator determinante para a utilização e comercialização dos extratos na indústria de uma perspectiva de segurança. Segundo Jayesh e co-autores (2017), o extrato aquoso de acetona de *Terminalia bellirica* não produziu toxicidade aguda em ratos e os estudos histopatológicos também confirmaram a natureza não tóxica do extrato [203].

O processo de remover a acetona e conseguir concentrar o extrato permite resultados ótimos no referente à potencialidade da aplicação de acetona. Considerando que a acetona se trata de um solvente com ponto de ebulição mais baixo que da água (56 e 100 °C, respetivamente), é possível conseguir a sua remoção dos extratos de forma menos dispendiosa em termos energéticos e consequentemente económicos. Tendo em conta que o calor latente de vaporização da água é de 540 cal/g e o da acetona corresponde a 122 cal/g, é possível calcular a quantidade de energia (cal) necessária para evaporar 1 L das diferentes misturas de solventes (Figura 3.22).

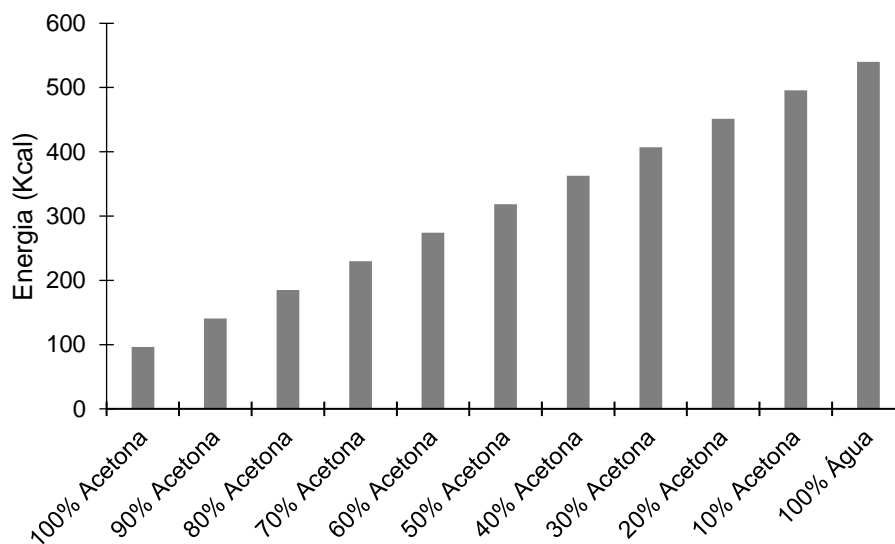


Figura 3.22 – Energia necessária para a evaporação de um litro de cada uma das misturas de solventes em estudo (Kcal).

Como seria expectável, é necessária uma menor quantidade de energia de forma a eliminar as misturas de solvente, comparativamente à evaporação apenas de água. Por outro lado, sabendo a massa de compostos fenólicos totais extraídos em cada fração 1 do refluxo, é possível determinar a energia correspondente a essa massa para cada mistura de solvente testada (Figura 3.23).

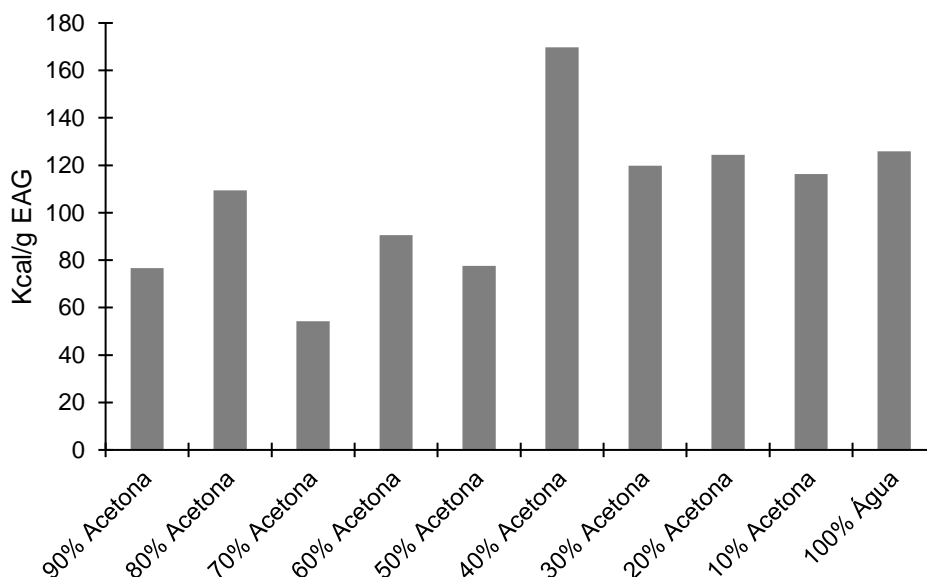


Figura 3.23 – Energia por massa de fenólicos totais, para cada extrato obtido na fração 1 de refluxo para os diferentes solventes em estudo.

O valor obtido para o extrato 100% acetona não se encontra representado, dado que a massa de equivalentes de ácido gálico é muito reduzida, e o valor obtido de Kcal/g EAG é de 3817,7 Kcal/g EAG.

Como se pode verificar na figura acima, para os extratos produzidos com 50 e 60% de acetona, o balanço entre gasto energético e massa de fenólicos recuperados é bastante interessante quando comparado com percentagens mais elevadas de incorporação de água. Estes dois extratos apresentaram teores bastante significativos de compostos fenólicos totais, bem como de atividade anti-radicalar, sendo que estes resultados permitem validar a utilização de misturas, nesta proporção, de água e acetona.

Por outro lado, é de salientar que as flutuações nestes cálculos se devem em parte a passos inerentes à metodologia de extração, como por exemplo, a recuperação do extrato, dado que para as primeiras fração de refluxo, não se recupera o volume total de solvente inicial da extração, afectando assim a massa de extrato e consequentemente outros cálculos posteriores.

A poupança energética em termos de extração pode compensar o investimento num outro solvente, neste caso, a acetona, dado que as características dos extratos produzidos com as misturas, particularmente 60% acetona, são comparáveis às obtidas com o extrato aquoso.

Por outro lado, é possível também considerar a aplicação estes extratos numa formulação líquida, dado que terão valores de compostos fenólicos bastante elevados, e restando apenas água, que é um solvente inócuo, estes extratos terão mais facilidade em ser aplicados na indústria alimentar, apresentado a vantagem da diminuição de custos devido à necessidade de apenas eliminar acetona. A acetona apresenta-se como um solvente de classe 3 e portanto, a sua eliminação compreenderia valores vestigiais, de forma a não exceder o limite de 50 mg/dia. Estes resultados permitem discutir o desenvolvimento de um procedimento de extração sustentável e eficiente energeticamente, utilizando solventes adequados para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos, com facilidade numa transição da escala laboratorial para uma escala maior.

3.4 Análise dos compostos presentes em extratos de café selecionados, por HPLC-DAD

Os extratos produzidos por refluxo, fração 1, com 100% acetona, 60% acetona, 50% acetona, 10% acetona, 100% água e hidróxido de cálcio 0,01%, foram selecionados para análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Estes extratos foram selecionados com base nas características exibidas ao longo deste trabalho, como por exemplo o seu teor de compostos fenólicos totais e a sua atividade anti-radicalar.

A análise cromatográfica foi realizada em modo varrimento total entre 190 e 700 nm e com a aquisição seletiva aos comprimentos de onda de 280 e 320 nm, de forma a maximizar a deteção dos grupos de compostos mais significativos nos extratos de café, que têm máximos de absorção nesses comprimentos de onda, nomeadamente cafeína e ácidos hidroxicinâmicos. A identificação e posterior quantificação foi realizada apenas para picos com abundâncias relativas superiores a 4%.

A 280 nm os principais componentes detetados nos extratos em análise foram ácido gálico e cafeína. A 320 nm os principais compostos detetados foram ácidos hidroxicinâmicos, mais especificamente o ácido clorogénico (5-ACG), os seus dois isómeros (3-ACG e 4-ACG) e o ácido cafeico. Detetaram-se também outros compostos, em ambos os comprimentos de onda, que se designaram apenas pelo seu grupo funcional, nomeadamente “ácido hidroxibenzóico” ou “ácido hidroxicinâmico”, pois não foi possível estabelecer a sua identidade individual. Os cromatogramas relativos aos diferentes extratos a 280 e 320 nm, encontram-se representados nas figuras 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28 e 3.29.

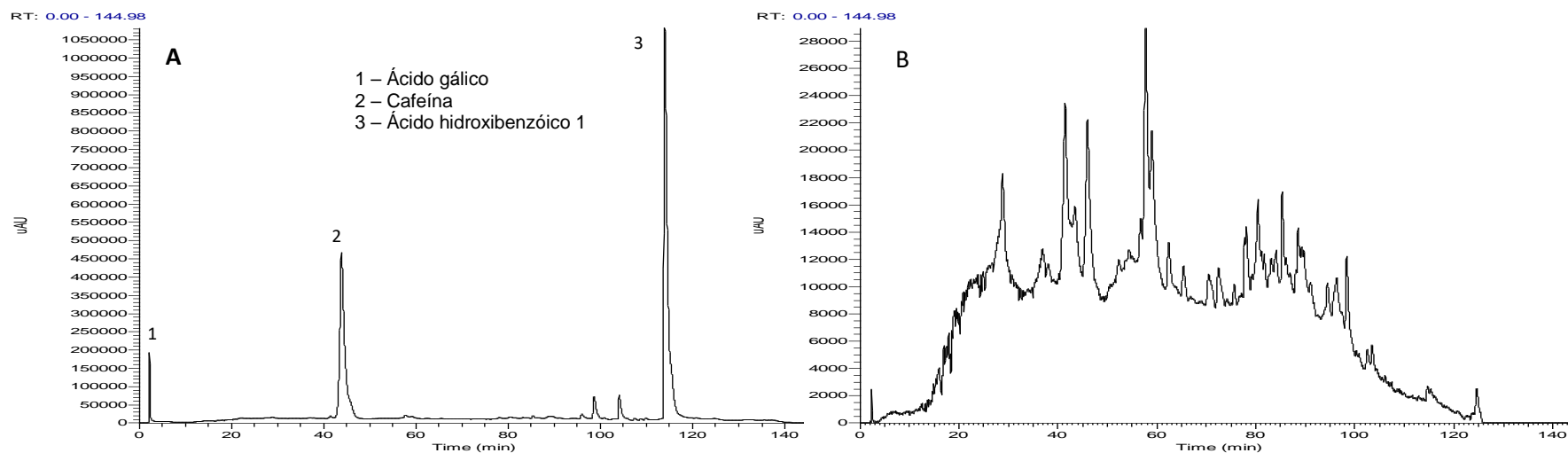


Figura 3.24 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 100% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.

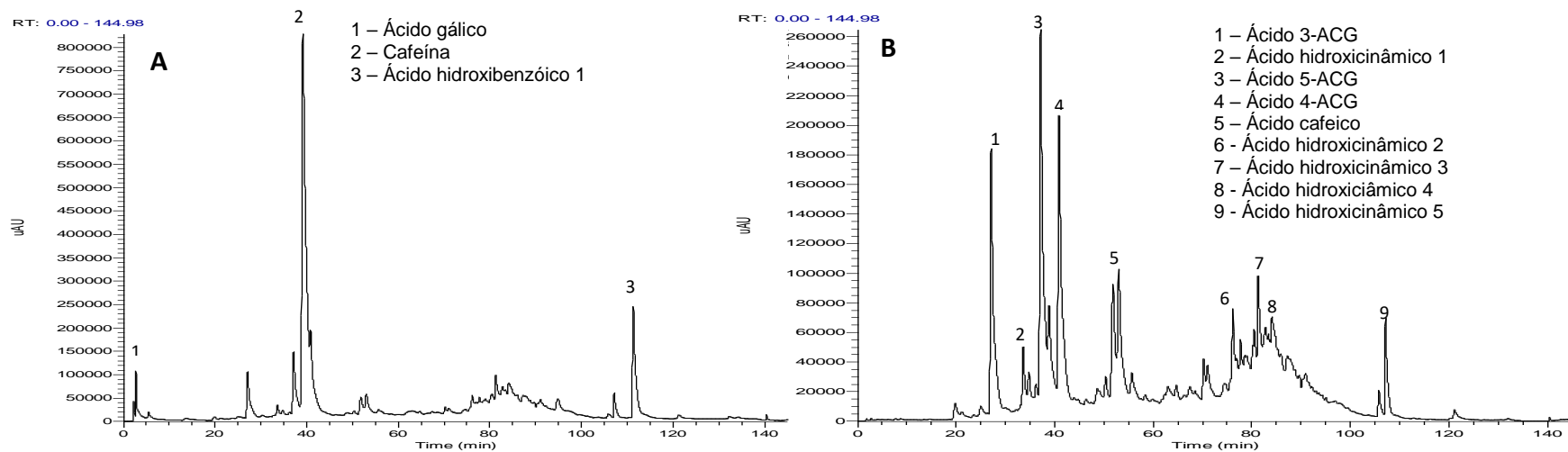


Figura 3.25 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 60% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.

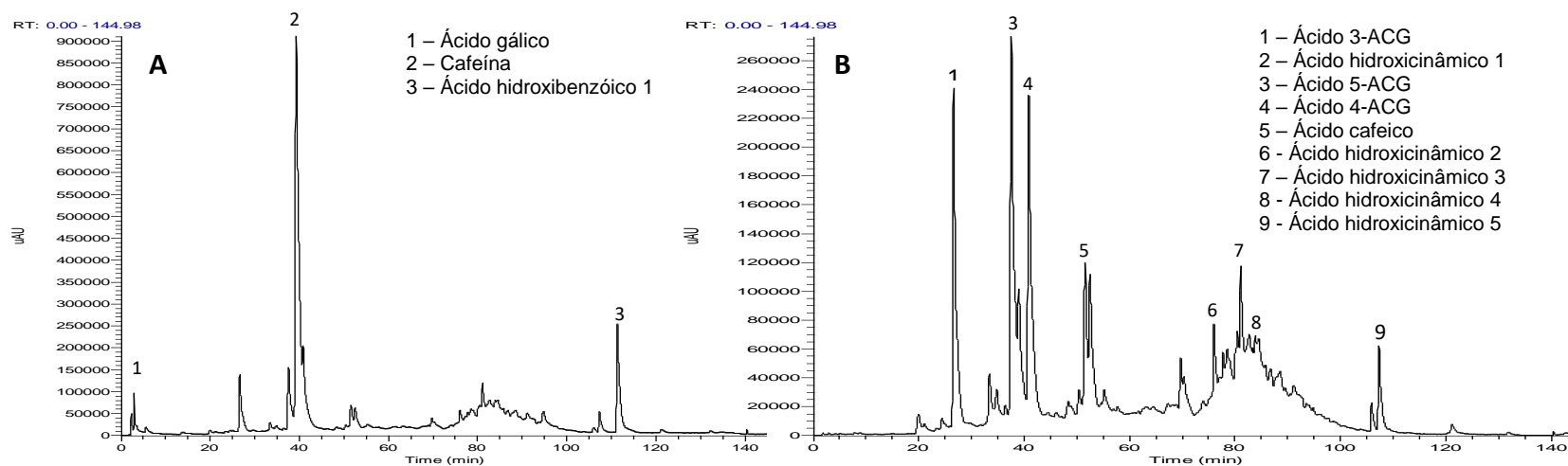


Figura 3.26 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 50% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.

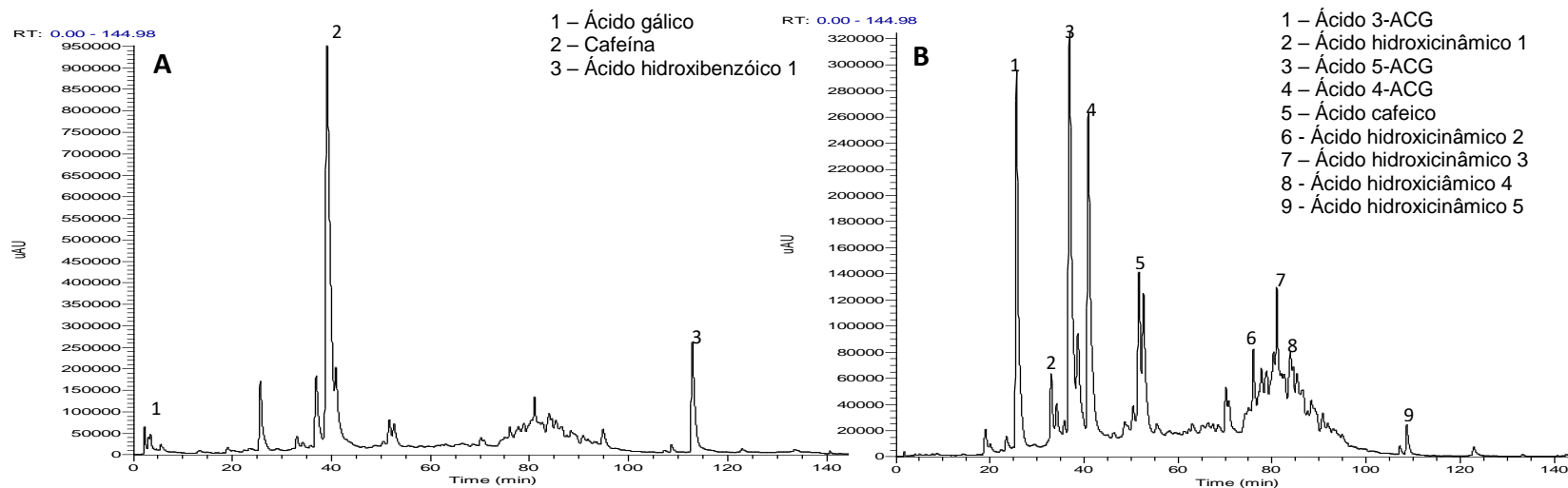


Figura 3.27 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 10% acetona. A - 280 nm; B – 320 nm.

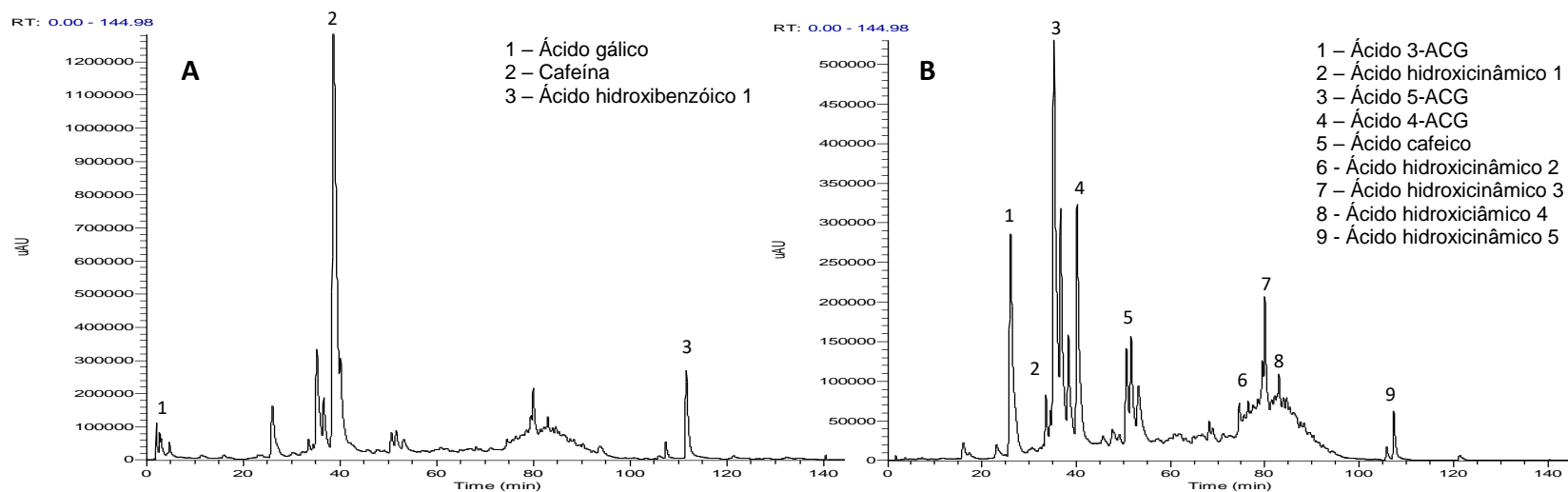


Figura 3.28 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com 100% água. A - 280 nm; B – 320 nm.

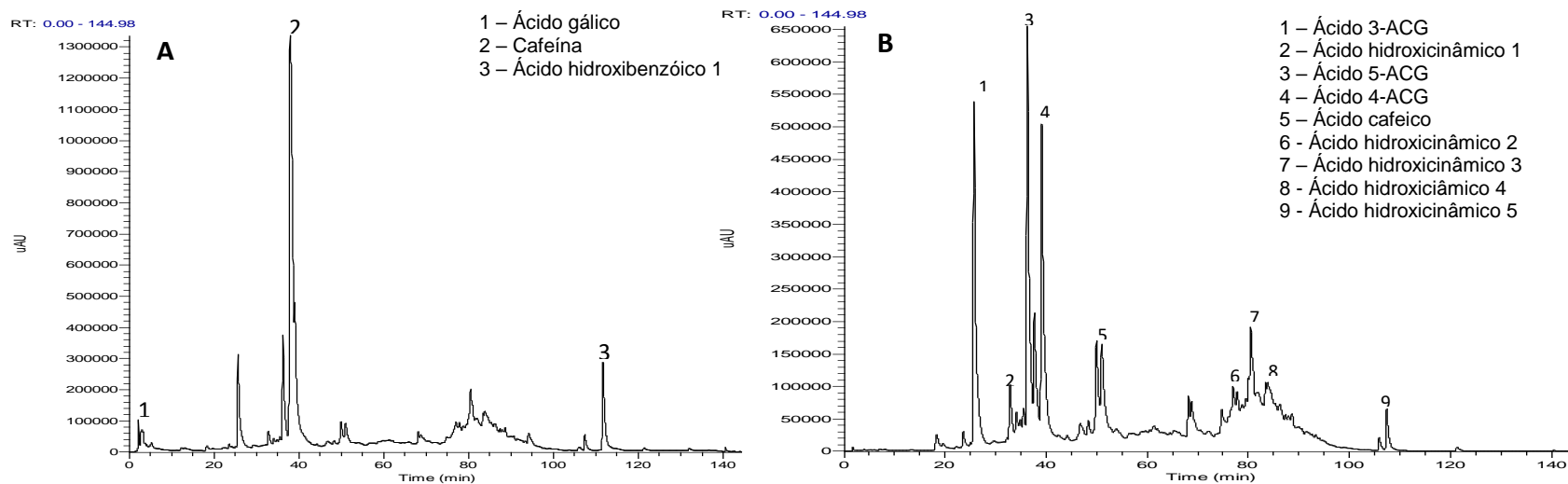


Figura 3.29 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato obtido com hidróxido de cálcio 0,01%. A - 280 nm; B – 320 nm

Como se pode observar nos cromatogramas acima representados a 320 nm, a utilização de 100% acetona não potencia a extração de ácidos clorogênicos (picos identificados como 1,3 e 4). Verifica-se um aumento na extração destes componentes com um aumento da incorporação de água nas misturas de solvente.

Os picos identificados como 1 e 4 no comprimento de onda de 320 nm, correspondem aos isômeros do ácido clorogênico (pico 3, 5-ACG), 3-ACG e 4-ACG, respetivamente. Estes dois compostos foram identificados com base na sua ordem de eluição em cromatogramas e espectros de absorção descritos na literatura [154]. Por outro lado, os picos 6, 7 e 8 detectados a 320 nm, de acordo com Rodrigues e colaboradores (2013), correspondem a um conjunto de compostos identificados como ácidos feruolquínicos, coumaroilquínicos e cafeoil-lactonas [154].

Relativamente às áreas absolutas dos compostos representados nas figuras acima, observa-se também que os extratos com incorporação aquosa apresentam resultados consistentes entre si, havendo uma distinção clara quando comparados com o extrato produzido apenas com acetona.

A 280 nm, o pico mais evidenciado é o pico 2, que corresponde à cafeína. Este composto apresenta a sua área absoluta mais elevada nos extratos de 100% água e hidróxido de cálcio 0,01%, validando a água como um solvente muito adequado à sua extração. No entanto, para uma aplicação efetiva de extratos de café ou resíduos de café, será importante estabelecer um balanço entre a extração de cafeína e dos ácidos clorogênicos, sendo de interesse que se extraíam quantidades comparáveis de ácidos clorogênicos e outros compostos acoplados a uma quantidade menor de cafeína (Figura 3.30 e Figura 3.31).

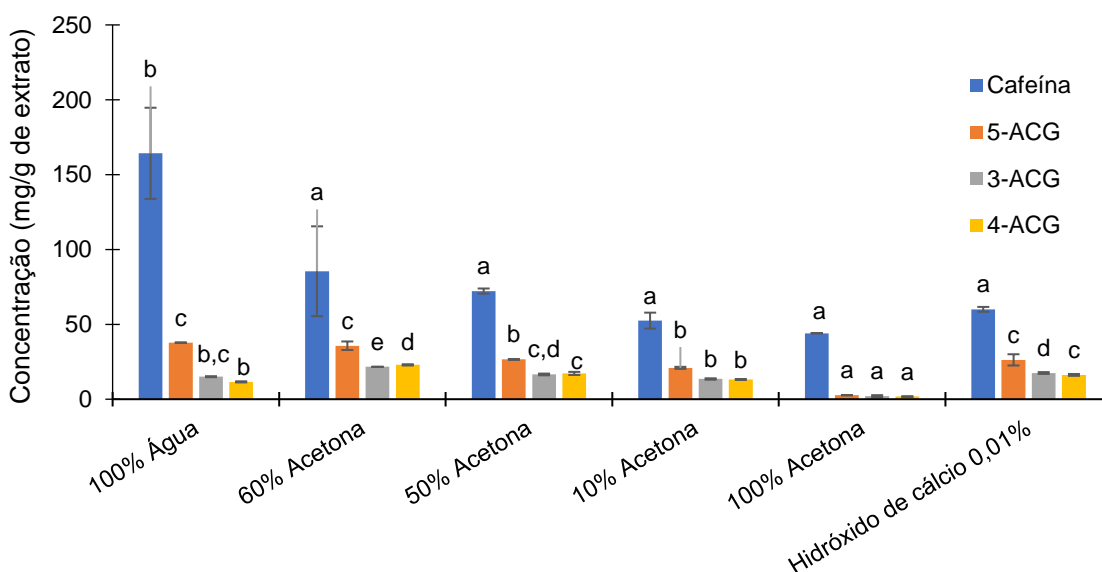


Figura 3.30 – Valores médios e desvios-padrão para as concentrações dos principais componentes dos extratos de café selecionados para análise em HPLC-DAD. Barras com a mesma cor classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

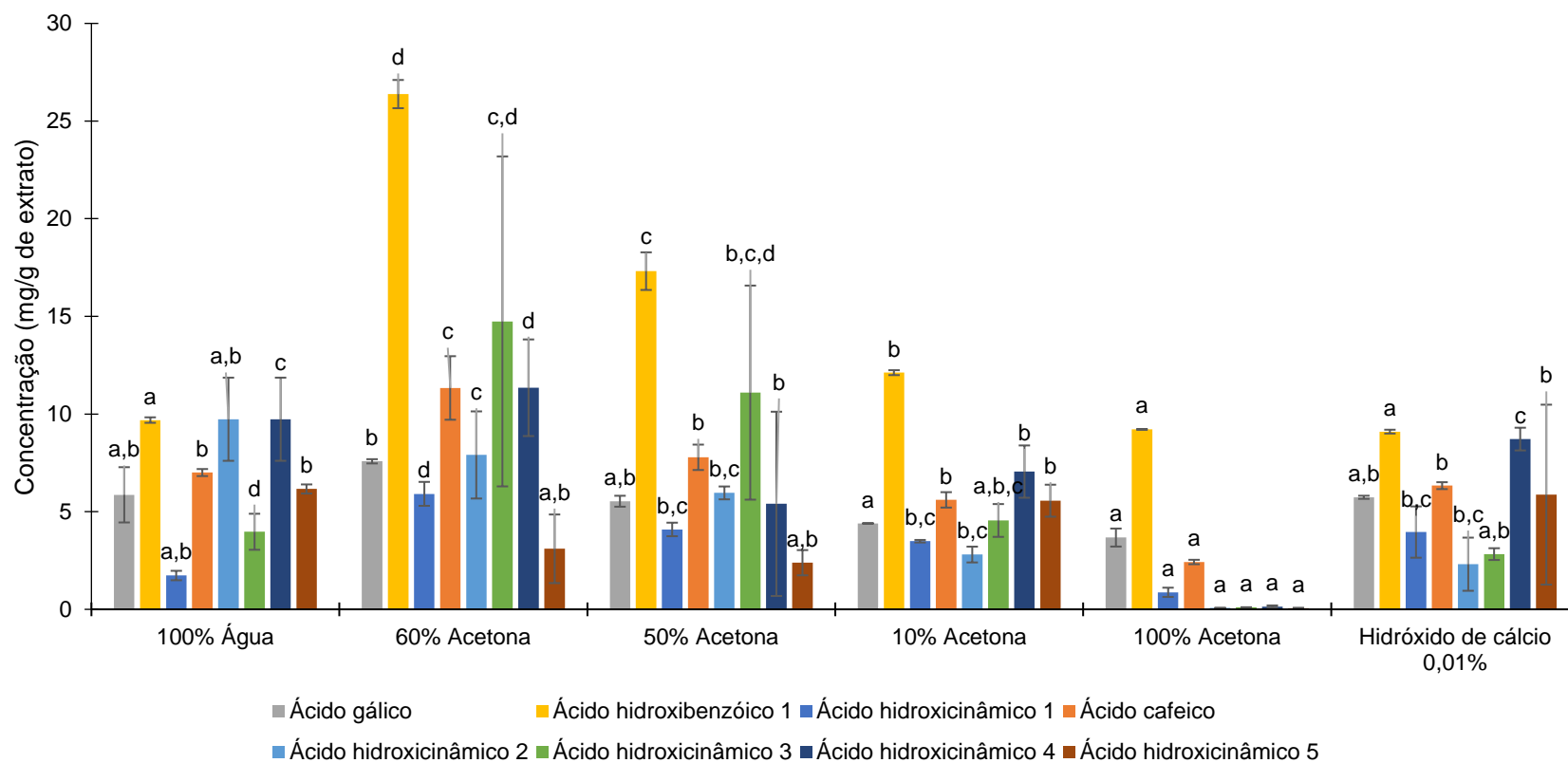


Figura 3.31 - Valores médios e desvios-padrão para as concentrações dos restantes componentes dos extratos de café selecionados para análise em HPLC-DAD. Barras com a mesma cor classificadas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 3.30, e como seria expectável, o extrato produzido com água apresenta a concentração mais elevada de cafeína, sendo que para os restantes extratos, este composto apresenta concentrações sem diferenças significativas. O extrato com menos potencial em termos de teor de cafeína e dos três ácidos clorogénicos em análise foi o extrato produzido exclusivamente com acetona.

Observando as concentrações obtidas para os três principais ácidos clorogénicos, verifica-se que as concentrações mais elevadas correspondem ao extrato de água (15,05 mg/g, 11,58 mg/g e 37,78 mg/g para os ácidos 3-ACG, 4-ACG e 5-ACG, respetivamente) e ao extrato produzido com acetona 60% água (21,61 mg/g, 22,93 mg/g e 35,72 mg/g para os ácidos 3-ACG, 4-ACG e 5-ACG, respetivamente). Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, obtidos no ponto 3.2.2.2, onde estes dois extratos exibiram concentrações muito significativas de fenólicos.

Estes resultados indicam que será possível produzir extratos com concentrações interessantes de ácidos clorogénicos utilizando uma mistura de acetona e água (60/40) ou também utilizando hidróxido de cálcio 0,01%, sendo que este extrato de água básica obteve uma baixa concentração de cafeína, mas uma concentração de 5-ACG comparável às obtidas com água ou com acetona 60% (25,27 mg/g). No entanto, relativamente ao extrato produzido com água básica é necessário especial atenção dado que foi relatado que as extrações com água básica podem potenciar reações químicas podendo induzir a formação de compostos que não são típicos em extratos de café [107].

De acordo com a literatura, o ácido clorogénico maioritário em extratos produzidos a partir de diferentes matrizes da indústria do café é o 5-ACG [157] [60][59][204][156], o que se encontra em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho. Os resultados acerca de concentração de ácidos clorogénicos na literatura são bastante dispersos, no sentido em que os valores são expressos em diferentes unidades, mas maioritariamente encontram-se expressos em unidades correspondentes à concentração de ACGs na bebida de café. Por outro lado, o interesse na determinação de valores de concentração para componentes do café incide na variação dos diferentes compostos de acordo com a metodologia de torrefação, espécie de café e técnica de produção da bebida (expresso, café de filtro, mocha, cápsula etc.) [155].

Oliveira-Neto e co-autores (2016) relatam valores de concentração para 5-ACG entre 3,19 e 78,08 mg/g de extrato, para extratos de café preparados por infusão com água quente, sendo que o grande intervalo de determinação se deve maioritariamente às diferentes origens dos cafés estudados [60]. No presente trabalho, os valores obtidos encontram-se dentro do intervalo sugerido anteriormente, embora significativamente inferiores ao limite mais elevados.

Franca e colaboradores (2005) estudaram grãos de café verde defeituosos e normais da espécie *Coffea* e determinaram uma concentração de 5-ACG de 3,18% [205]. Monteiro e Farah (2012) determinaram teor de 5-ACG entre 3,59 e 3,91% para café arábica do Brasil [74]. Na presente dissertação, o teor mais elevado de ácido clorogénico determinado foi de cerca de 3,7%, para o extrato produzido com água.

Relativamente aos outros compostos detetados nos extratos, observa-se a mesma tendência, sendo que o extrato de acetona 60% exhibe, num geral, concentrações mais elevadas desses compostos, e o extrato de acetona 100% possui as concentrações mais baixas. O composto identificado como ácido hidroxibenzóico 1, exhibe um comportamento interessante dado que apresenta concentrações elevadas apenas para as misturas de solventes, e por outro lado apresenta concentrações mais baixas e sem diferenças significativas para os extratos produzidos com acetona, água e água básica.

3.5 Avaliação da digestão gastrointestinal *in vitro* num extrato de café seleccionado

Para que os compostos bioativos possam exercer as suas atividades biológicas em tecidos e células ao longo do aparelho digestivo, devem resistir ao processo de digestão gastrointestinal, ser absorvidos e não serem biotransformados por enzimas, em metabolitos sem atividade biológica. Por outro lado, alguns metabolitos são ativados pelo processo de digestão gastrointestinal que promove a sua hidrólise relativamente a componentes não ativos ou que modulam a sua atividade.

Com o intuito de avaliar o processo de digestão gastrointestinal simulada de um extrato representativo, relativamente aos extratos produzidos neste trabalho, seleccionou-se o extrato produzido por refluxo com 100% água (fração 1), que apresentou um elevado teor de compostos fenólicos. Este extrato foi submetido a digestão gástrica simulada e a digestão gastrointestinal simulada, sendo que na figura 3.32 se observam os resultados obtidos para o extrato original, e para a fração solúvel após a digestão gástrica e gastrointestinal simulada.

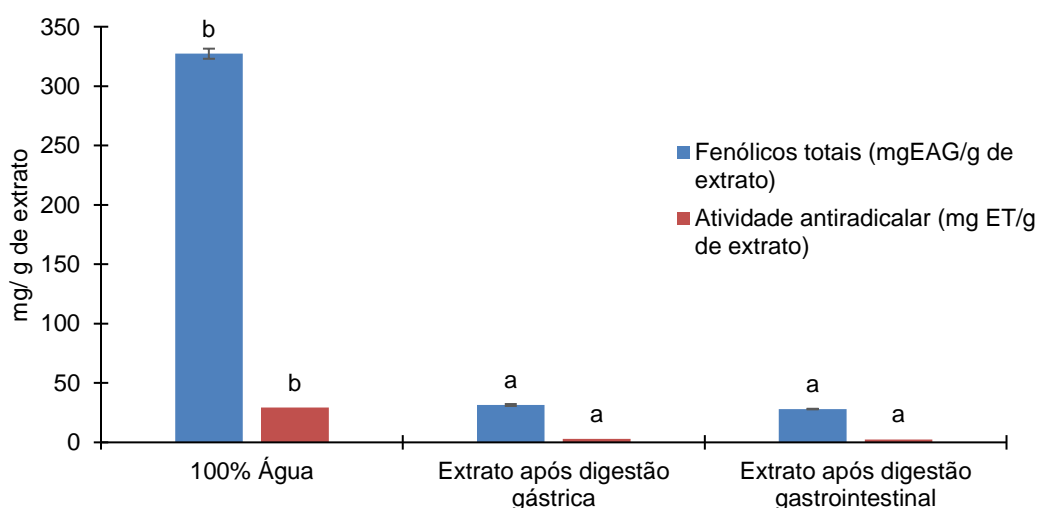


Figura 3.32 - Valores médios e desvios-padrão para o teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de extrato) e atividade anti-radicalar (mg ET/g extrato) obtidos no extrato original de 100% água, extrato após digestão gástrica (pH 2) e extrato após a digestão gastrointestinal (pH 6).

O extrato original apresenta um teor de compostos fenólicos na ordem de 327 mg EAG/g extrato e a um valor de atividade anti-radicalar de 29 mg EAG/g extrato. Depois da digestão gástrica verifica-se um decréscimo dos dois parâmetros, no caso dos compostos fenólicos determinou-se uma diminuição aproximada de 90%. Para o caso da atividade anti-radicalar a redução de compostos sequestradores de radicais foi de 89% (3,02 mg ET/g extrato).

Na digestão gastrointestinal a diminuição de fenólicos totais foi de 91% em relação ao extrato original e a atividade anti-radicalar também apresentou um decréscimo em relação ao extrato original na ordem dos 91%. Com isto verifica-se que a fração biodisponível de fenólicos totais no intestino corresponde a 1% do teor inicial ingerido.

O extrato aquoso de café sujeito a digestão gastrointestinal simulada foi também analisado por HPLC-DAD). A concentração dos compostos identificados e quantificados em dois comprimentos de onda, 280 e 320 nm, tal como descrito no ponto 2.6 e realizado no ponto 3.4. Nas figura 3.33 e 3.34 encontram-se representados os cromatogramas dos digeridos (280 e 320 nm) e as concentrações determinadas, respetivamente.

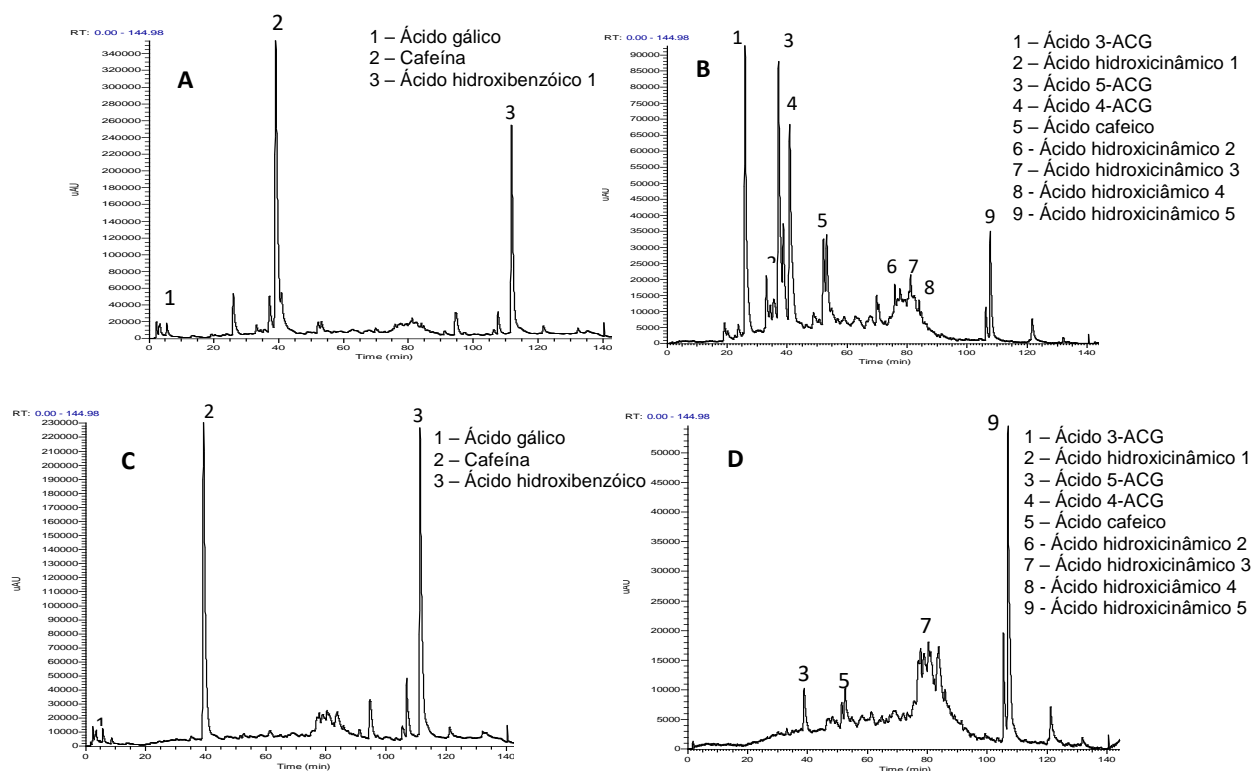


Figura 3.33 - Cromatogramas obtidos por injeção em HPLC-DAD do extrato produzido com 100% água após digestão gástrica e digestão gastrointestinal simuladas.. A - 280 nm, digestão gástrica; B - 320 nm, digestão gástrica; C- 280 nm, digestão gastrointestinal; D - 320 nm, digestão gastrointestinal.

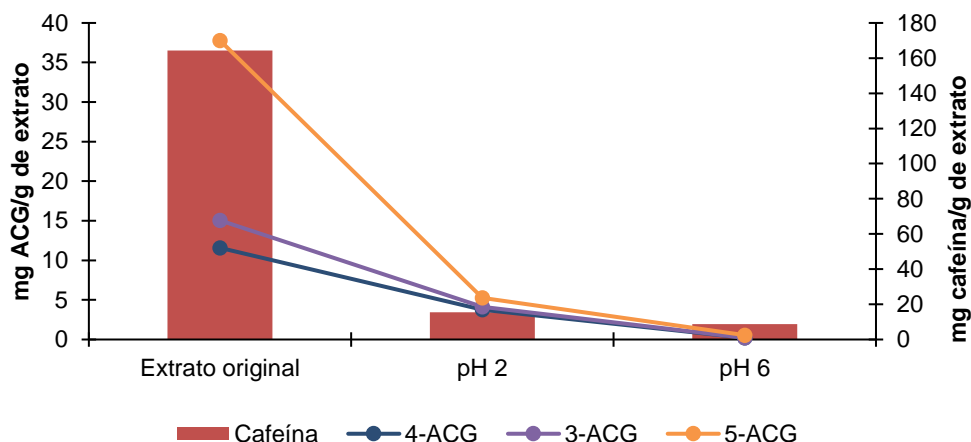


Figura 3.34 - Evolução dos principais componentes do extrato de café (extrato produzido por refluxo, fração 1, 100% água), identificados a 280 e 320 nm, por HPLC-DAD, no extrato bruto, digestão gástrica simulada (pH 2) e digestão gastrointestinal simulada (pH 6).

Em geral, observou-se uma redução na concentração dos compostos analisados por HPLC (a 280 e 320 nm) quando o extrato aquoso de café foi sucessivamente incubado a pH=2 e pH=6, sendo a diminuição mais acentuada observada na transição do extrato original a pH=2, enquanto na transição de pH=2 para pH=6 se observaram decréscimos ligeiros para todos os compostos.

A digestão gástrica provocou uma diminuição acentuada das concentrações dos compostos fenólicos sobretudo na transição do extrato de café original para pH=2, o que foi especialmente visível para a cafeína > 5-ACG > 3-ACG > 4-ACG.

A cafeína é absorvida pelo trato gastrointestinal de forma rápida e completa, apresentando uma biodisponibilidade de 100%. O tempo em que se alcança a concentração máxima no plasma é de 35 a 40 minutos, no entanto pode prologar-se com alguns fatores, nomeadamente a ingestão de alimentos [206]. Neste trabalho a simulação gástrica foi realizada durante 2 h, uma das possíveis razões da abrupta diminuição na concentração de cafeína pode dever-se ao tempo prolongado de contato da cafeína num meio ácido, e pela presença de outros compostos orgânicos e enzimáticos com os quais pode ter reagido.

O ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-ACG) no extrato original exibiu uma concentração inicial de 37,78 mg/g extrato, no entanto depois do tratamento a pH=2 verificou-se um decréscimo para 25 mg /g extrato, ou seja, durante a digestão gástrica ocorreu um decréscimo na concentração deste composto de cerca de 86%. No processo de digestão gastrointestinal a pH=6, verificou-se uma diminuição de 96% em relação ao extrato inicial. Siracusa e colaboradores (2011) reportam uma perda de cerca de 58,10% de padrão de ácido clorogénico (5-ACG) na digestão gástrica e cerca de 95,70% na digestão gastrointestinal [207]. Comparativamente ao determinado neste trabalho, as perdas de 5-ACG no passo da digestão gástrica foram mais elevadas.

Budryn e co-autores (2009) indicam que um pré-requisito para a absorção de ácidos clorogénicos no trato gastrointestinal é a sua hidrólise para os ácidos quínico e cafeico no intestino delgado, onde aproximadamente um terço do ácido clorogénico consumido é absorvido [136].

Segundo Stalmach e colaboradores (2014), a dose de polifenol ingerida tem um impacto importante na biodisponibilidade. Ou seja, doses mais elevadas podem apresentar efeitos diferentes das doses mais baixas de polifenóis ingeridos. Especificamente, os autores demonstraram que o ácido clorogénico do café reduziu a sua biodisponibilidade em humanos, quando ingerido em doses mais elevadas [208].

Nutrientes como proteínas, carboidratos e lípidos, que envolvem moléculas polifenólicas dentro do trato gastrointestinal, têm um grande impacto na bioacessibilidade e biodisponibilidade de polifenóis [209]. Essas interações com nutrientes conferir aos polifenóis um papel muito diferente. Eles podem proteger os polifenóis da oxidação durante a passagem pelo trato gastrointestinal fazendo-os chegar ao cólon mais intactos [210]. Isto representa uma limitação no ensaio *in vitro* realizado neste trabalho, dado que este tipo de ensaios não permite a ocorrência de efeitos sinérgicos entre os compostos fenólicos e outros nutrientes existentes em matrizes que são ingeridas. Assim, verifica-se neste trabalho, uma redução do ácido clorogénico e dos seus isómeros depois da digestão gástrica demonstrando a sua baixa concentração e limitando a sua biodisponibilidade.

Farah e colaboradores (2008) realizaram um dos primeiros estudos relativos à biodisponibilidade de ácidos clorogénicos enquanto família de compostos presentes em extratos de café verde. De acordo com os resultados deste estudo, a biodisponibilidade dos ácidos clorogénicos variou entre 7,8 to 72,1% entre os participantes do estudo. Os autores afirmam, no entanto, que este estudo é contraditório relativamente a outros trabalhos que afirma que os ácidos clorogénicos, em particular o 5-ACG apresentam absorções muito baixas em estudos com humanos e ratos [211].

Na figura 3.35 observam-se os outros compostos identificados por HPLC a 280 e 320 nm, presentes no extrato original, e nos digeridos.

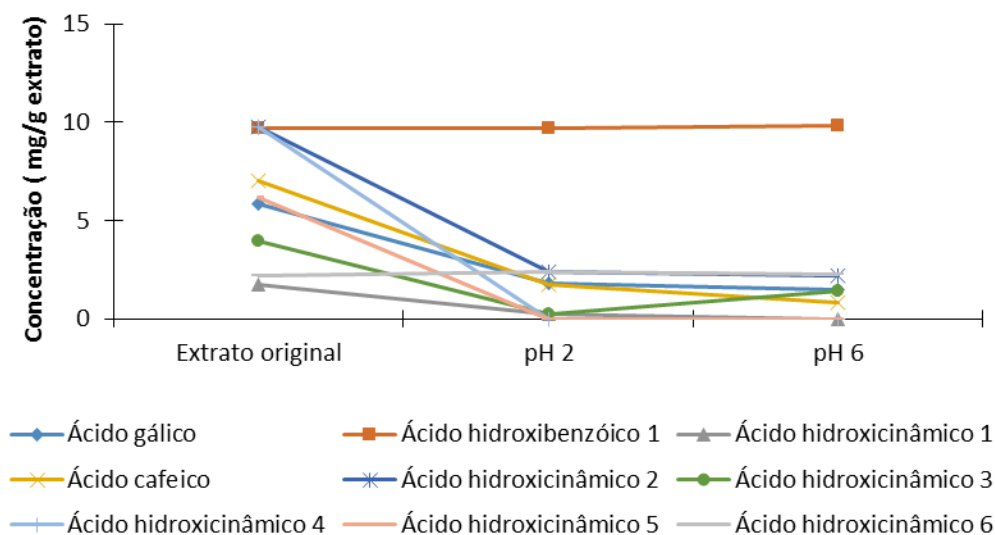


Figura 3.35 - Evolução dos compostos identificados a 280 e 320 nm (por HPLC-DAD) no extrato bruto, digestão gástrica simulada (pH 2) e digestão gastrointestinal simulada (pH 6).

O ácido gálico no extrato original encontrava-se num teor de 5,9 mg EAG/g extrato, após digestão gástrica (pH=2) apresenta um decréscimo de 70% (1,8 mg EAG/g extrato) e depois do tratamento a pH=6 a redução final em relação ao composto original foi de 75%. Assim a fração biodisponível de ácido gálico para o sistema, segundo o determinado neste estudo foi de 24,9% em relação ao extrato inicial.

No caso do ácido cafeico, após digestão gástrica observa-se uma diminuição de 75% em relação ao seu teor inicial. Na digestão gastrointestinal simulada o decréscimo total foi de 88%. Considerando isto, o que fica biodisponível no sistema intestinal é 12% do conteúdo inicial de ácido cafeico.

Os outros compostos determinados no sistema HPLC são ácidos hidroxibenzóico 1 e vários ácidos hidroxicinâmicos, identificados a 280 e 320 nm respetivamente. Embora não tenha sido possível identificar cada composto individualmente, foi possível identificar a sua família.

A redução na bioacessibilidade e portanto da biodisponibilidade dos compostos fenólicos simples durante a digestão gastrointestinal tem sido referida por diversos autores como consequência da sua reatividade elevada, resultante do maior número de grupos OH livres e do tamanho molecular mais baixo (que facilita a sua mobilidade), quando comparados com polifenóis e compostos fenólicos complexados.

O ácido hidroxibenzóico 1 e o ácido hidroxicinâmico 6, não apresentaram reduções consideráveis após digestão gastrointestinal simulada, demonstrando assim um comportamento estável em condições de pH=2 e pH=6, e justificando um futuro estudo mais detalhado da sua estrutura.

Regra geral, os estudos de bioacessibilidade são de difícil comparação devido a diversas variáveis que podem influenciar a digestão gastrointestinal, tais como a amostra selecionada para a quantificação, as unidades utilizadas para reportar os resultados ou o tempo de contacto utilizado nas diferentes fases da digestão. Outro parâmetro importante a ter em conta em processos de digestão *in vitro* será a expressão dos resultados em termos de concentração nas frações digeridas, que poderão vir a ser comprometidos por fatores de diluição utilizados ao longo da metodologia aplicada.

Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo e o seu sistema produtivo dá origem a quantidades significativas de diferentes resíduos, como por exemplo os lotes de café sem qualidade para comercialização.

O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização de propriedades químicas e funcionais de extratos de café, produzidos a partir de um lote de café rejeitado por questões de cor e aroma, de modo a valorizar um dos subprodutos desta indústria, com o fim de sugerir soluções sustentáveis em termos de processo de extração, solventes a utilizar e aplicabilidade dos extratos.

Os resultados obtidos para os rendimentos de extração demonstraram que, para a extração por maceração, a acetona 60% apresentou o melhor rendimento e na extração por refluxo, a utilização de água ou água básica favoreceram o rendimento de extração. Das 5 frações avaliadas na extração por refluxo, para cada solvente, em geral observa-se que a frações 1 resultaram num maior rendimento de extração comparativamente às restantes frações e isto verifica-se principalmente à medida que a percentagem de água aumenta. Assim sendo conclui-se que em extrações sólido-líquido com aplicação de temperatura, se conseguem-se rendimentos superiores que os obtidos no processo por maceração (extração a frio).

Relativamente ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante medidos nos diversos extratos produzidos, para a técnica de maceração todos os extratos de café apresentaram atividade antioxidante, sendo que o extrato de acetona 60% foi aquele que apresentou um maior teor de compostos fenólicos. No entanto a acetona 80% demonstrou uma maior atividade antioxidante relativamente aos restantes extratos estudados (mg/g extrato), o que sugere que o extrato com compostos fenólicos superiores pode não ser o extrato com mais atividade anti-radicalar. Tal ficou comprovado através da correlação ínfima positiva ($r=0,06$) que existe entre o teor de fenólicos totais e a atividade anti-radicalar para a extração por maceração. Por outro lado, nos extratos obtidos por refluxo, a acetona 10% apresentou o maior teor de compostos fenólicos, embora o extrato de água 100% tenha apresentado uma maior atividade anti-radicalar. No caso da extração por refluxo, a correlação entre teor de compostos fenólicos e atividade anti-radicalar apresentou-se como fortemente positiva ($r=0,8$).

Para os dois sistemas de extração, a acetona 100% resultou no menor teor de fenólicos totais, devendo-se possivelmente às características polares dos compostos fenólicos que dificultaram a extração eficiente com apenas acetona. A combinação solvente:água permitiu a maior extração de compostos fenólicos tanto para o processo a frio como a quente, no entanto a extração por refluxo resultou com maior rendimento de compostos antioxidantes.

Este trabalho representa inovação no sentido em que foram testadas diversas combinações de acetona:água, acetona, água e hidróxido de cálcio 0,01% como solventes, não tendo sido encontradas na literatura variações tão extensas nas diferentes proporções de solvente de extração, em matrizes de café. Por outro lado, a acetona não é um solvente muito explorado na extração de compostos bioativos a partir de café ou resíduos de café, e como foi documentado neste trabalho, a utilização de acetona apresenta vantagens significativas, não só ao nível das suas propriedades físico-químicas enquanto solvente, mas também em termos de utilização em escalas maiores relativamente à potencial poupança energética associada à sua utilização.

A atividade antimicrobiana está associada à composição antioxidante dos compostos, no entanto a os extratos produzidos não apresentaram atividade antimicrobiana para as estirpes de bactérias analisadas, para concentrações de extrato de 50 e 100 mg/mL. Neste contexto seria interessante experimentar técnicas mais sensíveis de modo a avaliar a capacidade antimicrobiana destes dos extratos de café produzidos nas condições discutidas neste trabalho.

Outra das vertentes deste trabalho foi a identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos produzidos, para solventes selecionados, por HPLC-DAD. Estes ensaios permitiram verificar que a cafeína é o composto maioritário presente nestes extratos, seguida do ácido 5-ACG, 3-ACG e 4-ACG, como expectável. Uma observação interessante foi a de que o extrato produzido com 60% acetona apresentou teores de ácidos clorogénicos comparáveis aos obtidos no extrato produzido com água, com a vantagem de possuir uma menor quantidade de cafeína do que o extrato aquoso.

A fração 1 do extrato produzido por refluxo com água, foi ainda submetida a digestão gástrica e gastrointestinal *in vitro*, sendo os digeridos e o extrato original avaliados para a sua atividade anti-radicalar e teor de compostos fenólicos totais, bem como a sua verificação por HPLC-DAD. Os resultados demonstraram que depois da simulação gástrica, a maioria dos compostos são instáveis ao pH do estômago ficando um reduzido teor de compostos fenólicos biodisponíveis após esta etapa. Estes resultados sugerem a necessidade de encontrar formulações que permitam estabilizar estes compostos durante a fase gástrica.

Os resultados obtidos com esta parte do trabalho dão um contributo o conhecimento científico acerca das propriedades químicas e funcionais de extratos de café rejeitado, no entanto são apenas uma pequena parte daquilo que é necessário estudar para se poder efetuar uma extrapolação dos resultados *in vitro* para a situação *in vivo*. Futuros estudos poderiam ser feitos para estudar de forma mais aprofundada a otimização do processo de extração, bem como o isoladamente e purificação de compostos bioativos de interesse. Além disso, seria também interessante avaliar de forma mais detalhada os processos de digestão gastrointestinal de forma a elucidar o comportamento e estabilidade destes extratos no trato gastrointestinal, para elucidar acerca das suas potencialidades em termos de sua aplicação na indústria alimentar. Outro ponto a estudar futuramente seria a avaliação da utilização de extratos através de

diferentes formulações mais aceitáveis para o mercado alimentar, cosmético ou farmacêutico, como por exemplo a incorporação dos compostos bioativos de café em biofilmes, ou a sua microencapsulação.

Este trabalho representa um passo nas potencialidades de valorização de uma matéria-prima que atualmente apenas possui valorização energética. A produção de extratos com propriedades nutracêuticas a partir de café rejeitado apresenta potencial para se inserir no conceito de economia circular, dado que os compostos bioativos extraídos podem apresentar um elevado valor acrescentado, e o café após extração poderá então ser utilizado para fins energéticos, dando origem a um ciclo de produção de resíduos zero.

Referências bibliográficas

- [1] P. S. Francisco, “História do café,” 2017. [Online]. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/historia-do-brasil/historia-do-cafe>. [Acedido a: 02-Maio-2017].
- [2] A. L. Martins, *História do Café*. São Paulo: Contexto, 2008.
- [3] J. Jaramillo, *El café en Venezuela*, 2ª ed. Editorial de la Biblioteca-Colección Ciencias Biológicas, 1996.
- [4] J. Carvajal, *Cafeto: Cultivo y Fertilización*, 2ª ed. Berna: Instituto Internacional de la Potasa, 1984.
- [5] N. Sakiyama, A. Pereira, e L. Zambolim, “Melhoramento de café arábica,” in *Melhoramento de diversas espécies cultivadas*, 2ª ed., UFV, Ed. Viçosa: Bórem, 1999, pp. 184–204.
- [6] F. Souza, J. Santos, J. Costa, e M. Santos, “Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia,” *Relatório EMBRAPA*, 2004.
- [7] S. L. El Halal, “Composição, Processamento e Qualidade Do Café,” Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2008.
- [8] B. Rothfos, *Coffee production*. Hamburgo: Salish Sea Books, 1980.
- [9] P. Esquivel e V. M. Jiménez, “Functional properties of coffee and coffee by-products,” *Food Res. Int.*, vol. 46, no. 2, pp. 488–495, 2012.
- [10] A. A. Nuhu, “Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification,” *ISRN Nutr.*, vol. 2014, pp. 1–13, 2014.
- [11] É. B. Patay, T. Bencsik, e N. Papp, “Coffee,” *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 1127–1135, 2016.
- [12] M. Clifford e K. Wilson, Eds., *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, 1st ed. Westport: Avi Publishing Company, 1985.
- [13] S. Oestreich-Janzen, *Chemistry of Coffee*, March 2013. Elsevier Inc., 2013.
- [14] P. S. Murthy e M. Naidu, “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 66, pp. 45–58, 2012.
- [15] P. R. A. B. Toledo, L. Pezza, H. R. Pezza, e A. T. Toci, “Relationship Between the Different Aspects Related to Coffee Quality and Their Volatile Compounds,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, no. 4, pp. 705–719, 2016.
- [16] M. I. Casas, M. J. Vaughan, P. Bonello, B. McSpadden Gardener, E. Grotewold, e A. P. Alonso, “Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans,” *Food Res. Int.*, vol. 95, pp. 59–67, 2017.
- [17] A. Jiménez-Zamora, S. Pastoriza, e J. A. Rufián-Henares, “Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 61, no. 1, pp. 12–18, 2015.
- [18] R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H. Vergara-Castañeda, e B. D. Oomah, “Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 1, pp. 24–36, 2015.
- [19] ICO, “Portugal - Infogram, charts & infographics,” *International Coffee Organization*, 2017. [Online]. Disponível em: https://infogr.am/_/S268nTQ9nsOy58h5VJZH. [Acedido a: 01-Jun-2017].
- [20] N. Rodríguez e D. Zambrano, “Los subproductos del café: fuente de energía renovable,” *Cenicafé - Avances Técnicos*, vol. 393, pp. 1-8, 2010.
- [21] Y. Narita e K. Inouye, “Review on utilization and composition of coffee silverskin,” *Food Res. Int.*, vol. 61, pp. 16–22, 2014.

- [22] S. Mussatto, "Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin," in *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., 2016, pp. 93–106.
- [23] T. Tokimoto, N. Kawasaki, T. Nakamura, J. Akutagawa, e S. Tanada, "Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 281, pp. 56–61, 2005.
- [24] V. A. Bonilla-Hermosa, W. F. Duarte, e R. F. Schwan, "Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds," *Bioresour. Technol.*, vol. 166, pp. 142–150, 2014.
- [25] R. Bressani e J. González, "Evaluación de la pulpa de café como sustituto del maíz on raciones para pollos de carne," *Arch. Lationamericanos Nutr.*, vol. 28, pp. 208–211, 1978.
- [26] S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, L. M. Carneiro, e J. A. Teixeira, "Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates," *Appl. Energy*, vol. 92, pp. 763–768, 2012.
- [27] E. Cantergiani, W. Andlauer, A. Heeger, e A. Kosin, "Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 969–975, 2017.
- [28] J. Tello, M. Viguera, e L. Calvo, "The Journal of Supercritical Fluids Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var . Robusta) husks using supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 59, pp. 53–60, 2011.
- [29] M. N. Clifford, "Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 79, no. 3, pp. 362–372, 1999.
- [30] F. Behrouzian, A. M. Amini, A. Alghooneh, e S. M. A. Razavi, "Characterization of dietary fibre from coffee silverskin: An optimization study using response surface methodology," *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*, vol. 8, pp. 58–64, 2016.
- [31] B. Fernandez-Gomez, A. Lezama, e M. Dolores, "Insights on the health benefits of the bioactive compounds of coffee silverskin extract," *J. Funct. Foods*, vol. 25, pp. 197–207, 2016.
- [32] R. C. Borrelli, F. Esposito, A. Napolitano, A. Ritieni, e V. Fogliano, "Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1338–1343, 2004.
- [33] Nestlé, "Nestlé pledges to achieve Zero Waste in Europe by 2020," 2013. [Online]. Disponível em: <http://www.nestle.co.uk/media/pressreleases/Zero-Waste-by-2020>. [Acedido: 01-Jun-2017].
- [34] A. Burniol-Figols, K. Cenian, I. V. Skiadas, e H. N. Gavala, "Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds," *Biochem. Eng. J.*, vol. 116, pp. 54–64, 2015.
- [35] J. Bae, "Production of bio-sugar and bioethanol from coffee residue (CR) by acid-," *Bioresour. Technol.*, 2017.
- [36] S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins, e J. A. Teixeira, "Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 173–179, 2011.
- [37] A. Zorro e R. Lavecchia, "Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy," *J. Clean. Prod.*, vol. 34, pp. 49–56, 2012.
- [38] Y. Liu, Q. Tu, G. Knothe, e M. Lu, "Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production," *Fuel*, vol. 199, pp. 157–161, 2017.
- [39] N. Tuntiwiwattanapun, E. Monono, D. Wiesenborn, e C. Tongcumpou, "In-situ transesterification process for biodiesel production using spent coffee grounds from the instant coffee industry," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 102, pp. 23–31, 2017.

- [40] J. Kim, H. Kim, G. Baek, e C. Lee, "Anaerobic co-digestion of spent coffee grounds with different waste feedstocks for biogas production," *Waste Manag.*, vol. 60, pp. 322–328, 2017.
- [41] K. Jung, B. Hyun, M. Hwang, T. Jeong, e K. Ahn, "Fabrication of granular activated carbons derived from spent coffee grounds by entrapment in calcium alginate beads for adsorption of acid orange 7 and methylene blue," *Bioresour. Technol.*, vol. 219, pp. 185–195, 2016.
- [42] X. Ma e F. Ouyang, "Adsorption properties of biomass-based activated carbon prepared with spent coffee grounds and pomelo skin by phosphoric acid activation," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 268, pp. 566–570, 2013.
- [43] C. Santos, J. Fonseca, A. Aires, J. Coutinho, e H. Trindade, "Effect of different rates of spent coffee grounds (SCG) on composting process , gaseous emissions and quality of end-product," *Waste Manag.*, vol. 59, pp. 37–47, 2017.
- [44] S. Poopathi e C. Mani, "Chapter 32 - Use of Coffee Husk Waste for Production of Biopesticides for Mosquito Control," in *Coffee in Health and Disease Prevention*, V. R. Preedy, Ed. San Diego: Academic Press, 2015, pp. 293–300.
- [45] D. Pleissner, A.K. Neu, K. Mehlmann, R. Schneider, G. I. Puerta-Quintero, e J. Venus, "Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales," *Bioresour. Technol.*, vol. 218, pp. 167–173, 2016.
- [46] P.S. B. Yadira, S.T. Sergio, S. E. L. Fernando, P. J. Sebastian, e D. Eapen, "Bioethanol Production from Coffee Mucilage," *Energy Procedia*, vol. 57, pp. 950–956, 2014.
- [47] B. Fernandez-Gomez, S. Ramos, L. Goya, M. D. Mesa, M. D. del Castillo, e M. Á. Martín, "Coffee silverskin extract improves glucose-stimulated insulin secretion and protects against streptozotocin-induced damage in pancreatic INS-1E beta cells," *Food Res. Int.*, vol. 89, pp. 1015–1022, 2016.
- [48] A. Pourfarzad, H. Mahdavian-Mehr, e N. Sedaghat, "Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 50, no. 2, pp. 599–606, 2013.
- [49] R. Cruz, E. Mendes, Á. Torrinha, S. Morais, J. A. Pereira, P. Baptista, e S. Casal, "Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach," *Food Res. Int.*, vol. 73, pp. 190–196, 2015.
- [50] A. S. Franca, L. S. Oliveira, e M. E. Ferreira, "Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds," *Desalination*, vol. 249, no. 1, pp. 267–272, 2009.
- [51] A. Sampaio, G. Dragone, M. Vilanova, J. M. Oliveira, J. A. Teixeira, e S. I. Mussatto, "Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.
- [52] S. Phimsen, W. Kiatkittipong, H. Yamada, T. Tagawa, K. Kiatkittipong, N. Laosiripojana, e S. Assabumrungrat, "Oil extracted from spent coffee grounds for bio-hydrotreated diesel production," *Energy Convers. Manag.*, vol. 126, pp. 1028–1036, 2016.
- [53] CBI, "CBI Buyer Requirements : Coffee in Europe," *CBI Market Intelligence*, 2016. [Online]. Disponível em: https://www.cbi.eu/sites/default/files/market_information/researches/buyer-requirements-europe-coffee-2016.pdf. [Acedido a: 01-Jun-2017].
- [54] L. Oliveira, A. Franca, J. Mendonça, e M. Barros-Júnior, "Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 39, no. 3, pp. 235–239, 2006.
- [55] K. Ramalakshmi, L. J. M. Rao, Y. Takano-Ishikawa, e M. Goto, "Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems," *Food Chem.*, vol. 115, no. 1, pp. 79–85, 2009.

- [56] ICO, "Production data," 2017. [Online]. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. [Acedido a: 01-Jun-2017].
- [57] K. Ramalakshmi, I. R. Kubra, e L. J. M. Rao, "Antioxidant potential of low-grade coffee beans," *Food Resear. Int.*, vol. 41, pp. 96–103, 2008.
- [58] V. Brezová, A. Šlebodová, e A. Staško, "Coffee as a source of antioxidants: An EPR study," *Food Chem.*, vol. 114, no. 3, pp. 859–868, 2009.
- [59] M. Jeszka-Skowron, E. Stanisz, e M. P. De Peña, "Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 243–250, 2016.
- [60] J. R. Oliveira-Neto, S. G. Rezende, C. de Fátima Reis, S. R. Benjamin, M. L. Rocha, e E. de Souza Gil, "Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples," *Food Chem.*, vol. 190, pp. 506–12, 2016.
- [61] M. Oroian e I. Escriche, "Antioxidants: Characterization , natural sources , extraction and analysis," *Food Resear. Int.*, vol. 74, pp. 10–36, 2015.
- [62] D. V. Ratnam, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana, e M. N. V. R. Kumar, "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective," *J. Control. Release*, vol. 113, no. 3, pp. 189–207, 2006.
- [63] P. Angelo e N. Jorge, "Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão," *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, vol. 66, no. 1, pp. 1–9, 2007.
- [64] M. Naczki e F. Shahidi, "Extraction and analysis of phenolics in food," *J. Chromatogr. A*, vol. 1054, pp. 95–111, 2004.
- [65] B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Urbe, e S. O. Serna-Saldívar, "Bound phenolics in foods , a review," *Food Chem.*, vol. 152, pp. 46–55, 2014.
- [66] J. Dai e R. J. Mumper, "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties", *Molecules*, pp. 7313–7352, 2010.
- [67] M. Shahidi e F. Naczki, *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, vol. 57, no. 3. Lancaster -USA: Technomic Publishing Co. Inc, 1995.
- [68] P. Valentão, "Limonete, Hiperício-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da- Terra : Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica : Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora," Universidade do Porto, Portugal, 2002.
- [69] E. Stelmach, P. Pohl, e A. Szymczycha-Madeja, "The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews," *Food Chem.*, vol. 182, pp. 302–308, 2015.
- [70] Y. Yashin, J. Wang, e B. Nemzer, "Antioxidant and antirational activity of coffee," *Antioxidants*, vol. 2, no. 4, p. 2013, 2013.
- [71] G. Lozano-Vazquez, C. Lobato-Calleros, H. Escalona-Buendia, G. Chavez, J. Alvarez-Ramirez, e E. J. Vernon-Carter, "Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads," *Food Hydrocoll.*, vol. 48, pp. 301–311, 2015.
- [72] C. Rice-Evans, N. Miller, e G. Paganga, "Antioxidant properties of phenolic compounds," *Trends Plant Sci.*, vol. 4, no. 2, p. 1997, 1997.
- [73] M. de L. R. Giada, "Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power," in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, J. A. Morales-González, Ed. Rijeka: InTech, 2013.
- [74] M. C. Monteiro e A. Farah, "Chlorogenic acids in Brazilian Coffea arabica cultivars from various consecutive crops," *Food Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 611–614, 2012.
- [75] R. Upadhyay, K. Ramalakshmi, e L. Jagan Mohan Rao, "Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans," *Food Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 184–188, 2012.

- [76] Y. Yan, N. Liu, N. Hou, L. Dong, e J. Li, "Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 46, pp. 68–73, 2017.
- [77] M.P. Gonthier, M.A. Verny, C. Besson, C. Rémésy, e A. Scalbert, "Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in rats," *J. Nutr.*, vol. 133, no. 6, pp. 1853–1859, 2003.
- [78] A. S. Cho, S. M. Jeon, M. J. Kim, J. Yeo, K. Il Seo, M. S. Choi, e M. K. Lee, "Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 3, pp. 937–943, 2010.
- [79] T. Mahmood, F. Anwar, M. Abbas, e N. Saari, "Effect of maturity on phenolics (Phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 4591–4607, 2012.
- [80] J. Aguiar, B. N. Estevinho, e L. Santos, "Microencapsulation of natural antioxidants for food application - The specific case of coffee antioxidants - A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 58, pp. 21–39, 2016.
- [81] M. H. Kweon, H. J. Hwang, e H. C. Sung, "Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 4646–4655, 2001.
- [82] Y. Mikami e T. Yamazawa, "Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity," *Life Sci.*, vol. 139, pp. 69–74, 2015.
- [83] J. G. Xu, Q. P. Hu, e Y. Liu, "Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 46, pp. 11625–11630, 2012.
- [84] A. Mathew e D. Tiroutchelvalme, "Study on the effect of solvents in extraction of green coffee beans and its decaffeination," *Sci. Technol.*, vol. 2, no. 5, pp. 42–57, 2016.
- [85] T. M. McLellan, J. A. Caldwell, e H. R. Lieberman, "A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 71, pp. 294–312, 2016.
- [86] D. C. Mitchell, C. A. Knight, J. Hockenberry, R. Teplansky, e T. J. Hartman, "Beverage caffeine intakes in the U.S.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 63, pp. 136–142, 2014.
- [87] N. J. Frost-Meyer e J. V Logomarsino, "Impact of coffee components on inflammatory markers: A review," *J. Funct. Foods*, vol. 4, no. 4, pp. 819–830, 2012.
- [88] M. Spiro e J. Hunter, "The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee: The effect of roasting," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 36, pp. 871–876, 1985.
- [89] L. Bell, C. Wetzal, e A. Grand, "Caffeine conte in coffee as influenced by grinding and brewing techniques," *Food Res. Int.*, vol. 29, no. 8, pp. 785–789, 1996.
- [90] G. Caprioli, M. Cortese, F. Maggi, M. C. L. Odello, G. Sagratini, e S. Vittori, "Quantification of caffeine, trigonelline and nicotinic acid in espresso coffee: The influence of espresso machines and coffee cultivars," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 65, no. 4, pp. 465–469, 2014.
- [91] "Caffeine Chemistry," 2017. [Online]. Disponível em: <https://www.thoughtco.com/chemistry-of-caffeine-608500>. [Acedido a: 22-Maio-2017].
- [92] W. Barz, "Metabolism and Degradation of Nicotinic acid in Plant Cell Cultures, Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures," in *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, 1985, pp. 186–195.
- [93] Y. Koshiro, X.Q. Zheng, M.L. Wang, C. Nagai, e H. Ashihara, "Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of Coffea arabica and Coffea canephora fruits," *Plant Sci.*, vol. 171, no. 2, pp. 242–250, 2006.
- [94] P. Mazzafera, "Trigonelline in coffee," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 7, pp. 2309–2310, 1991.
- [95] H. Ashihara, "Plant Biochemistry: Trigonelline Biosynthesis in Coffea arabica and Coffea

- canephora,” in *Coffee in Health and Disease Prevention*, V. Preedy, Ed. San Diego: Academic Press, 2015, pp. 19–28.
- [96] D. Perrone, C. Donangelo, e A. Farah, “Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry,” *Food Chem.*, vol. 110, no. 4, pp. 1030–1035, 2008.
- [97] M. M. Naidu, G. Sulochanamma, S. R. Sampathu, e P. Srinivas, “Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee,” *Food Chem.*, vol. 107, pp. 377–384, 2008.
- [98] L. Zhou, A. Khalil, F. Bindler, M. Zhao, C. Marcic, S. Ennahar, e E. Marchioni, “Effect of heat treatment on the content of individual phospholipids in coffee beans,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 3846–3850, 2013.
- [99] L. Trugo, “An investigation of coffee roasting using high performance liquid chromatography,” *Food Chem.*, vol. 19, pp. 1–9, 1986.
- [100] A. Farah, “Coffee Constituents,” in *Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 1st ed., Y.-F. Chu, Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012, pp. 21–58.
- [101] E. Guercia, F. Berti, L. Navarini, N. Demitri, e C. Forzato, “Tetrahedron: Asymmetry Isolation and characterization of major diterpenes from *C. canephora* roasted coffee oil,” *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 27, no. 14–15, pp. 649–656, 2016.
- [102] A. A. Nuhu, “Bioactive micronutrients in coffee: recent analytical approaches for characterization and quantification,” *ISRN Nutr.*, vol. 2014, p. 384230, 2014.
- [103] G. Gross, E. Jaccaud, e A. Hugget, “Analysis of the Content of the Diterpenes Cafestol and Kahweol in Coffee Brews,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 35, pp. 547–554, 1997.
- [104] H. Xu, W. Wang, X. Liu, F. Yuan, e Y. Gao, “Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 76, pp. 946–954, 2015.
- [105] E. M. Marinova e N. V. Yanishlieva, “Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil,” *Food Chem.*, vol. 58, no. 3, pp. 245–248, Mar. 1997.
- [106] U. D. Chavan e R. Amarowicz, “Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.),” *Int. Food Res. J.*, vol. 20, no. 3, pp. 1139–1144, 2013.
- [107] J. Bravo, C. Monente, I. Juárez, M. P. De Peña, e C. Cid, “Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee,” *Food Res. Int.*, vol. 50, no. 2, pp. 610–616, 2013.
- [108] D. Uppal, A. Sharma, e K. Tewari, “Green coffee bean extract and method thereof.” Google Patents, 17-Dec-2015.
- [109] V. K. Amlathe e S ; Gupta, “Spectrophotometric Determination of Acetone Using Vanillin,” vol. 115, no. October, pp. 1385–1387, 1990.
- [110] M.T. Bustard, E.M. McEvoy, J.A.S Goodwin, J.G. Burgess e P. Wright, “Biodegradation of propanol and isopropanol by a mixed microbial consortium”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, pp. 424–431, 2000.
- [111] M. T. Bustard, “Bioconversion of isopropanol by a solvent tolerant *Sphingobacterium mizutae* strain”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 975–983, 2006.
- [112] “ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents,” *European Medicines Agency*, 2013. [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104258.pdf. [Accessed: 18-Jun-2017].
- [113] L. R. G. Palomino e V. L. del Bianchi, “The effect of fungal fermentation in phenolics content in robusta coffee husk,” *Semin. Ciências Agrárias*, vol. 36, no. 2, pp. 777–786, 2015.

- [114] M. Geremu, Y. B. Tola, e A. Sualeh, "Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L .) pulp of wet processing plants," *Chem. Biol. Technol. Agric.*, pp. 1–6, 2016.
- [115] R. Upadhyay, K. Ramalakshmi, e L. J. M. Rao, "Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans," *Food Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 184–188, 2012.
- [116] M. L. Suárez-Quiroz, A. Alonso Campos, G. Valerio Alfaro, O. González-Ríos, P. Villeneuve, e M. C. Figueroa-Espinoza, "Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 33, no. 1, pp. 55–58, 2014.
- [117] M. Shaidi e F. Naczki, "Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications," *Lancaster Technomic Publ.*, pp. 281–319, 1995.
- [118] A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. José Núñez, e J. C. Parajó, "Natural antioxidants from residual sources," *Food Chem.*, vol. 72, no. 2, pp. 145–171, 2001.
- [119] C. A. Salamanca, N. Fiol, C. González, M. Saez, e I. Villaescusa, "Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso," *Food Chem.*, vol. 214, pp. 622–630, 2017.
- [120] Y. Shang, J. Xu, W. Lee, e B. Hum, "Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction," *South African J. Bot.*, vol. 109, pp. 75–80, 2017.
- [121] N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, e P. Maran Jeganathan, "Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 206–213, 2017.
- [122] O. Khelil, S. Choubane, e B. A. Cheba, "Polyphenols content of spent coffee grounds subjected to physico-chemical pretreatments influences lignocellulolytic enzymes production by *Bacillus* sp. R2," *Bioresour. Technol.*, vol. 211, pp. 769–773, 2016.
- [123] M. D. Pavlović, A. V Buntić, S. S. Šiler-Marinković, e S. I. Dimitrijević-Branković, "Ethanol influenced fast microwave-assisted extraction for natural antioxidants obtaining from spent filter coffee," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 118, pp. 503–510, 2013.
- [124] A. Zuurro, "Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 152, pp. 64–69, 2015.
- [125] S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins, e J. A. Teixeira, "Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 83, pp. 173–179, 2011.
- [126] A. T. Getachew e B. S. Chun, "Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 38, Part A, pp. 24–31, 2016.
- [127] A. M. Moreira Penna, "Avaliação do potencial de grãos defeituosos de café como substratos na produção de fibras com potencial antioxidante," Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2015.
- [128] R. Campos-Vega, K. Vázquez-Sánchez, D. López-Barrera, G. Loarca-Piña, S. Mendoza-Díaz, e B. D. Oomah, "Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability," *Food Res. Int.*, vol. 77, pp. 156–161, 2015.
- [129] V. Briones-Labarca, C. Munoz, e H. Maureira, "Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 4, pp. 875–883, 2011.
- [130] M. Swieca, U. Gawlik-Dziki, D. Dziki, e B. Baraniak, "Wheat bread enriched with green

- coffee - In vitro bioaccessibility and bioavailability of phenolics and antioxidant activity," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1451–1457, 2017.
- [131] R. Calvello, A. Aresta, A. Trapani, C. Zambonin, A. Cianciulli, R. Salvatore, M. L. Clodoveo, F. Corbo, C. Franchini, e M. A. Panaro, "Bovine and soybean milk bioactive compounds: Effects on inflammatory response of human intestinal Caco-2 cells," *Food Chem.*, vol. 210, pp. 276–285, 2016.
- [132] C. Dupas, A. Marsset Baglieri, C. Ordonaud, D. Tomé, e M.-N. Maillard, "Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 50, no. 11, pp. 1053–1060, 2006.
- [133] S. Hall, B. Desbrow, S. Anoopkumar-Dukie, A. K. Davey, D. Arora, C. McDermott, M. M. Schubert, A. V. Perkins, M. J. Kiefel, e G. D. Grant, "A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression," *Food Res. Int.*, vol. 76, pp. 626–636, 2015.
- [134] W. Shen, R. Qi, J. Zhang, Z. Wang, H. Wang, C. Hu, Y. Zhao, M. Bie, Y. Wang, Y. Fu, M. Chen, e D. Lu, "Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons," *Brain Res. Bull.*, vol. 88, no. 5, pp. 487–494, 2012.
- [135] J. S. P. Ruivo, "Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em Cosmética e Dermatologia," Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2012.
- [136] G. Budryn, E. Nebesny, A. Podsdek, D. Zyzelewicz, M. Materska, S. Jankowski, e B. Janda, "Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 228, no. 6, pp. 913–922, 2009.
- [137] Nielsen-Massey, "Coffee Extract," *King Arthur Flour Company, Inc.*, 2017. .
- [138] Earthwell, "Liquid Garcinia Cambogia with Green Coffee Bean Extract," *Health & Personal Care .Top 10 Best Green Coffee Bean Extracts Reviewed In 2017*, 2017. .
- [139] NatureWise, "Green Coffee Bean Extracts," *Barista Life*, 2017. .
- [140] F. Rodrigues, C. Pereira, F. B. Pimentel, R. C. Alves, M. Ferreira, B. Sarmento, M. H. Amaral, e M. B. P. P. Oliveira, "Are coffee silverskin extracts safe for topical use? An in vitro and in vivo approach," *Ind. Crops Prod.*, vol. 63, pp. 167–174, 2015.
- [141] L. Amigoni, M. Stuknytė, C. Ciaramelli, C. Magoni, I. Bruni, I. De Noni, C. Airoidi, M. E. Regonesi, e A. Palmioli, "Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*," *J. Funct. Foods*, vol. 33, pp. 297–306, 2017.
- [142] N. Martinez-Saez, M. Ullate, M. A. Martin-Cabrejas, P. Martorell, S. Genovés, D. Ramon, e M. D. Del Castillo, "A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin," *Food Chem.*, vol. 150, pp. 227–234, 2014.
- [143] S. Fu, C. Wu, T. Wu, H. Yu, S. Yang, e Y. Hu, "Preparation and characterisation of Chlorogenic acid-gelatin: A type of biologically active film for coating preservation," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 657–663, 2017.
- [144] M. Shahid, Y. Zhou, R. C. Tang, G. Chen, e W. A. Wani, "Colourful and antioxidant silk with chlorogenic acid: Process development and optimization by central composite design," *Dye. Pigment.*, vol. 138, pp. 30–38, 2017.
- [145] Method OIV-MA-AS2-10, "Folin-Ciocalteu Index," pp. 5–6, 2009.
- [146] Y. Chen, Y. Huang, e B. Huang, "Cordyceps sinensis mycelium activates PKA and PKC signal pathways to stimulate steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, pp. 214–223, 2005.
- [147] L. M. Magalhães, F. Santos, M. A. Segundo, S. Reis, e J. L. F. C. Lima, "Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity", *Talanta*, vol. 83, pp. 441–447, 2010.

- [148] H. Abramovic, T. Košmerl, e N. P. Ulrih, "Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine", *Food Chem.*, vol. 174, pp. 147–153, 2015.
- [149] V.L. Singleton e J.A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *Am. J. Enol. Vitic.*, vol.16, pp.144-158, 1965
- [150] M. E. Cuvelier e C. Berset, "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity", *Food Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 25–30, 1995.
- [151] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, e C. Berset, "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity," *Food Sci. Technol.*, vol. 28, pp. 25–30, 1995.
- [152] G. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, pp. 426–428, 1959.
- [153] K. Belguidoum, H. Amira-guebailia, Y. Boulmouk, e O. Houache, "Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers HPLC coupled to UV – vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 45, no. 4, pp. 1314–1320, 2014.
- [154] N. P. Rodrigues e N. Bragagnolo, "Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC – DAD – MS," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 32, no. 2, pp. 105–115, 2013.
- [155] M. Moeenfar, L. Rocha, e A. Alves, "Quantification of Caffeoylquinic Acids in Coffee Brews by HPLC-DAD," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2014, pp. 1–10, 2014.
- [156] A. P. Craig, C. Fields, N. Liang, D. Kitts, e A. Erickson, "Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts," *Talanta*, vol. 154, pp. 481–485, 2016.
- [157] C. E. Mills, M. J. Oruna-Concha, D. S. Mottram, G. R. Gibson, e J. P. E. Spencer, "The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 3335–3340, 2013.
- [158] S. Oestreich-Jansen, *Chemistry of Coffee*, Elsevier Inc., 2013.
- [159] W. Dong, R. Hu, Z. Chu, J. Zhao, e L. Tan, "Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans," *Food Chem.*, vol. 234, pp. 121–130, 2017.
- [160] A. L. S. Vasconcelos, A. S. Franca, M. B. A. Glória, e J. C. F. Mendonça, "A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans," *Food Chem.*, vol. 101, no. 1, pp. 26–32, 2007.
- [161] A.S. Franca, J.C.F. Mendonça, S.D. Oliveira, "Composition of green and roasted coffees of different cup qualities", *Food Chem.*, vol. 38, pp. 709–715, 2005.
- [162] R. Macrae, "Nitrogenous Components," in *Coffee: Volume 1: Chemistry*, R. J. Clarke and R. Macrae, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985, pp. 115–152.
- [163] L. C. Bastos de Maria, C.A. Alves Moreira e R.F. Trugo, "Componentes voláteis do café torrado: Compostos heterocíclicos," vol. 22, no. 2, pp. 209–217, 1998.
- [164] C. P. Passos e M. A. Coimbra, "Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds," *Carbohydr. Polym.*, vol. 94, no. 1, pp. 626–633, 2013.
- [165] R. J. Redgwell, C. Schmitt, M. Beaulieu, e D. Curti, "Hydrocolloids from coffee: physicochemical and functional properties of an arabinogalactan – protein fraction from green beans", *Food Hydrocoll.*, vol. 19, pp. 1005–1015, 2005.
- [166] A. Valenzuela e N. Morgado, "Las Grasas y aceites en la nutrición humana: Algo de su historia," *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 32, no. 2, pp. 88–94, 2005.
- [167] M. S. S. Marques, "Transformações físico-químicas e sensoriais durante o envelhecimento de café torrado em grão João," Instituto Superior de Agronomia,

Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2011.

- [168] J. M. Turatti, "Extração e caracterização de óleo de café," 2011, [Online]. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1291/155585_Art212f.pdf?sequence=1 [Acedido a: 02-Maio-2017].
- [169] G. N. Nikolova-Damyanova, B. Velikova e R. Jham, "Lipid classes , fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil", *Food Resear. Int.*, vol. 31, no. 6, 1999.
- [170] L. Manna, C. A. Bugnone, e M. Banchero, "Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 104, pp. 204–211, 2015.
- [171] R. M. Da Costa Magalhães, "Reaproveitamento do resíduo de café por extração de compostos de interesse," Universidade de Aveiro, Portugal 2014.
- [172] A. H. Goli, M. Barzegar, e M. A. Sahari, "Food Chemistry Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts", *AGRIS*, vol. 92, pp. 521–525, 2005.
- [173] J. Macheix, J.J. Fleuriot e A. Billot, *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1990.
- [174] R. L. Huang, D. Ou e B. Prior, "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, pp. 1841–1856, 2005.
- [175] S. Kallithraka, C. Garcia-Viguera, P. Bridle, e J. Bakker, "Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics," *Phytochem. Anal.*, vol. 6, no. 5, pp. 265–267, 1995.
- [176] V. Palomino García, L.R. Del Bianchi, "Antioxidant capacity in coffee industry residues," *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 18, no. 4, pp. 307–313, 2015.
- [177] C. Y. Kim, D.O Lee, K. W. Lee e H.J. Lee, "Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 13, pp. 3713–3717, 2002.
- [178] M. S. B. Sousa, L. M. Vieira, e A.Lima, "Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais," *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 14, no. 3, pp. 202–210, 2011.
- [179] E. Nebesny, D. Rachwa, K. Mi, J. Oracz, e Ž. Dorota, "Inclusion complexes of β - cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (Coffea canephora L .)", *Food Resear. Int.*, vol. 61, pp. 202–213, 2014.
- [180] A. Mathew, D. Tiroutchelvame, "Study on the effect of solvents in extraction of green coffee beans and its decaffeination" *Science&Technology*, vol. 2, no. 5, pp. 42–57, 2016.
- [181] U. Złotek, S. Mikulska, M. Nagajek, e M. Świeca, "The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (Ocimum basilicum L.) extracts," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 23, no. 5, pp. 628–633, 2016.
- [182] E. J. S. T. M. T. Cabral de Oliveira, A. B. Valentin, I. Fonseca, M. Silva e C.A. H. Bechara, "Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes", *Quím.Nova*, vol. 32, no. 3, pp. 689–702, 2009.
- [183] J. Michiels, J.A. Kevers, C. Pincemail, J. Defraigne e J.O. Dommes, "Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices," *Food Chem.*, vol. 130, no. 4, pp. 986–993, 2012.
- [184] M. Zakaria, "Evaluierung der phenolischen Inhaltsstoffe und der antioxidativen Aktivität von Kaffee und Kaffeeprodukten," Universidade de Viena, Áustria, 2013.
- [185] A. S. Pinelo, M. Tress, A.G. Pedersen, M. Arnous e A. Meyer, "Effect of cellulases, solvent

- type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds," *Am. J. Food Technol.*, vol. 2, no. 7, pp. 641–651, 2007.
- [186] J. H. Low, W. A. Rahman, e J. Jamaluddin, "The influence of extraction parameters on spent coffee grounds as a renewable tannin resource," *J. Clean. Prod.*, vol. 101, pp. 222–228, Aug. 2015.
- [187] A. Sentokowska, M. Jeszka-Skowron, e K. Pyrzynska, "Comparative Studies on the Antioxidant Properties of Different Green Coffee Extracts," *MOJ Food Process. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–6, 2016.
- [188] N. Dutta, A. Mukhopadhyay, A. K. Dasgupta, e K. Chakrabarti, "Bioresource Technology Improved production of reducing sugars from rice husk and rice straw using bacterial cellulase and xylanase activated with hydroxyapatite nanoparticles," *Bioresour. Technol.*, vol. 153, pp. 269–277, 2014.
- [189] A. P. Macías-Martínez e C. E. Riaño-Luna, "Café orgánico: caracterización, torrefacción y enfriamiento 1", *Cenicafé*, vol. 53, no. 4, pp. 281–292, 2002.
- [190] Z. Zeng, Y. Li, R. Yang, C. Liu, X. Hu, S. Luo, E. Gong, e J. Ye, "The relationship between reducing sugars and phenolic retention of brown rice after enzymatic extrusion," *J. Cereal Sci.*, vol. 74, pp. 244–249, 2017.
- [191] C. Constantinou eG. Koutsidis, "Investigations on the effect of antioxidant type and concentration and model system matrix on acrylamide formation in model Maillard reaction systems", *Food Chem.*, vol. 197, pp. 769–775, 2016.
- [192] EFSA, "European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011," *EFSA J.* 2013, vol. 11, no. 4, 2013.
- [193] E. Ceylan e D. Y. C. Fung, "Antimicrobial activity of spices," *J. Rapid. Methods Autom. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–55, 2004.
- [194] M. M. Tajkarimi, S. A. Ibrahim, eD. O. Cliver, "Antimicrobial herb and spice compounds in food," *Food Control*, vol. 21, no. 9, pp. 1199–1218, Sep. 2010.
- [195] G. Runti, S. Pacor, S. Colomban, R. Gennaro, L. Navarini, e M. Scocchi, "Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 62, no. 1, pp. 108–114, 2015.
- [196] D. Da Silva Oliveira, "Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos," Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2014.
- [197] C. Monente, J. Bravo, A. I. Vitas, L. Arbillaga, M. P. De Peña, e C. Cid, "Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms," *J. Funct. Foods*, vol. 12, pp. 365–374, 2015.
- [198] A. Amélia, P. Almeida, M. C. Vilaça, E. De Aguiar, M. Beatriz, e A. Glória, "inibição de salmonella typhimurium por compostos do café em diferentes valores de ph e eficiência conservante em um modelo alimentar," *V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2007.
- [199] G. J. E. Nychas, "Natural antimicrobials from plants," in *New Methods of Food Preservation*, G. W. Gould, Ed. Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 58–89.
- [200] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.
- [201] A. Wen, P. Delaquis, K. Stanich, e P. Toivonen, "Antilisterial activity of selected phenolic acids," *Food Microbiol.*, vol. 20, no. 3, pp. 305–311, 2003.
- [202] R. Papagiannopoulos, M. Wollseifen, H.R. Mellenthin, A. Haber, B. Galensa, "Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and

- Derived Products by HPLC-UV-ESI / MS", *J. Agri. Food Chem.*, pp. 3784–3791, 2004.
- [203] K. Jayesh, L. R. Helen, A. Vysakh, E. Binil, e M. S. Latha, "In vivo toxicity evaluation of aqueous acetone extract of Terminalia," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 86, pp. 349–355, 2017.
- [204] D. Modesta, A. Farah, D. F. Neves, L. C. Trugo, e A. Rosenthal, "Compostos fenólicos em café torrado," in *II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2001, pp. 1485–1492.
- [205] A. S. Franca, L. S. Oliveira, J. C. F. Mendonca, e A. Silva, "Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans," *Food Chem.*, vol. 90, pp. 89–94, 2005.
- [206] M. F. Lozano, R.P. García, Y.A. Tafalla e D.P. Albaladejo, "Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso," *Red Rev. Científicas América Lat. el Caribe, España y Port.*, vol. 19, no. 3, pp. 225–238, 2007.
- [207] L. Gayoso, A.S. Claerbout, M. I. Calvo, R. Y. Caverro, I. Astiasarán, e D. Ansorena, "Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models," *J. Funct. Foods*, vol. 26, pp. 428–438, 2016.
- [208] A. Stalmach, G. Williamson, e A. Crozier, "Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans," *Food Funct.*, vol. 5, no. 8, pp. 1727–1737, 2014.
- [209] B. Chanteranne, F. Branca, A. Kaardinal, P. Ladroite, F. Brouns, e V. Coxam, "Food matrix and iso flavones bioavailability in early post menopausal women : A European clinical study", *Clin. Interv. Aging.*, vol. 3, no. 4, pp. 711–718, 2008.
- [210] R. S. Macdonald, K. Wagner, R. S. Macdonald, e K. Wagner, "Influence of dietary phytochemicals and microbiota on colon cancer risk ", *J. Agri. Food Chem.*, vol.60, no.27, 2012.
- [211] A. Farah, M. Monteiro, C. M. Donangelo, e S. Lafay, "Chlorogenic Acids from, Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans," *J. Nutric.*, vol. 138, no.12, pp. 2309–2315, 2008.